

Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology

Revista de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica

www.epilepsia.org.br/jecn

Volume 18 – Number 4
December, 2012

- Temporal Transcript Profile of *bdnf*, *ntkr2a* and *ntkr2b* Genes in Zebrafish Brain
- Early Life Seizures and Their Long-Term Impacts on Cognition
- Environment Influence Over Epileptic Seizure Susceptibility
- EEG Source Imaging

Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology

Revista de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica
Órgão Oficial Trimestral da Liga Brasileira de Epilepsia

Editores

Fernando Cendes – Departamento de Neurologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas/SP
João Pereira Leite – Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento, Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto/SP

Editores Associados

André Palmini – Divisão de Neurologia, Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, PUCRS, Porto Alegre/RS
Elza Marcia Yacubian – Unidade de Pesquisa e Tratamento das Epilepsias, UNIFESP, São Paulo/SP
Fulvio Alexandre Scorza – Neurologia Experimental, UNIFESP, São Paulo/SP
Lauro Wichert Ana – FMUSP, Ribeirão Preto/SP

Conselho Editorial

Áurea Nogueira de Melo – Departamento de Medicina Clínica, Centro de Ciências da Saúde, UFRN, Natal/RN
Bernardo Dalla Bernardina – Università de Verona, Verona/Itália
Carlos Eduardo Silvado – Setor de Epilepsia e Eletroencefalografia, Hospital de Clínicas, UFPR, Curitiba/PR
Cesare Lombroso – Harvard Medical School, Boston/USA
Esper A. Cavalheiro – Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, UNIFESP, São Paulo/SP
Fernando Tenório Gameleira – Programa de Cirurgia de Epilepsia do Hospital Universitário, UFAL, Maceió/AL
Francisco José Martins Arruda – Departamento de Neurofisiologia Clínica, Instituto de Neurologia de Goiânia, Goiânia/GO
Frederick Anderman – Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal/Canadá
Gilson Edmar Gonçalves e Silva – Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina, UFPE, Recife/PE
Íscia Lopes-Cendes – Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas/SP
J. W. A. S. Sander – National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London/UK
Júlio Velluti – Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo/Uruguai

Kazuie Iinuma – Tohoko University, School of Medicine, Seiryomochi/Japan
Marelza Fernandez Veiga – Hospital Universitário “Edgard dos Santos”, UFBA, Salvador/BA
Marilisa Mantovani Guerreiro – Departamento de Neurologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas/SP
Maria Carolina Doretto – Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, Belo Horizonte/MG
Mirna Wetteres Portuguese – Divisão de Neurologia, Departamento de Medicina Interna e Pediatria, Faculdade de Medicina, PUCRS, Porto Alegre/RS
Natalio Fejerman – Hospital de Pediatria “Juan P. Garrahan”, Buenos Aires/Argentina
Norberto Garcia Cairasco – Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto/SP
Raul Ruggia – Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Montevideo/Uruguai
Roger Walz – Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário da UFSC; Centro de Cirurgia de Epilepsia de Santa Catarina (CEPESC), Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis/SC
Shlomo Shinnar – Albert Einstein College of Medicine, New York/USA
Solomon L. Moshé – Albert Einstein College of Medicine, New York/USA
Wagner Afonso Teixeira – Serviço de Epilepsia e Eletroencefalografia, Hospital de Base de Brasília, Brasília/DF

Contato:

Dr. Fernando Cendes (Editor)
Departamento de Neurologia – FCM, UNICAMP, Campinas/SP
Rua Gen. Carneiro, 181
80060-900, Campinas, SP, Brasil
[<fcendes@unicamp.br>](mailto:fcendes@unicamp.br)

Editoração eletrônica:

Supernova Editora
Porto Alegre, RS – Fone: (51)3386-1984

Ficha Catalográfica

Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology (Revista de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica) / Liga Brasileira de Epilepsia. – Vol. 1, n. 1 (1995)- . – Porto Alegre: Serviço de Neurologia do Hospital São Lucas da PUCRS, 1995-
v.; 28 cm; trimestral.
v. 1, 1995 – JLBE: Jornal da Liga Brasileira de Epilepsia
v. 2 a 7 (n. 2, jun. 2001) – Brazilian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology (Jornal Brasileiro de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica)
ISSN 1676-2649

CDD: 616.8
CDU: 616.853(05)
616.8-092(05)
616.8-073(05)

Índice para Catálogo Sistemático:

Epilepsia – Periódicos – 616.853(05);
Neurofisiologia – Periódicos – 616.8-092(05);
Eletroencefalografia – Periódicos – 616.8-073(05);
Eletroencefalografia – Periódicos – 616.8-073(05);
Neurologia – Fisiologia – Periódicos – 616.8-092(05)
(Bibliotecária responsável: Rosária Maria Lúcia Geremia – CRB 10/196)

Summary

*Journal of
Epilepsy and
Clinical
Neurophysiology*

J Epilepsy Clin Neurophysiol 2012;18(4):101-128

ISSN 1676-2649

Editorial / Editorial	105
Message of the President of the Brazilian League of Epilepsy / Mensagem do Presidente da LBE	106
Original Article / Artigo Original	
Análise temporal dos transcritos dos genes <i>bdnf</i> e <i>nrk2</i> em cérebro de <i>zebrafish</i> induzido à crise epilética por Pentilenotetrazol / Temporal transcript profile of <i>bdnf</i> , <i>nrk2a</i> and <i>nrk2b</i> genes in zebrafish brain after Pentilenotetrazole (PTZ)-induced seizure	107
<i>Fernanda Christina Reis Pinto, Patrícia Gonçalves Barbalho, Rafael Felipe Pires Mangolin, Claudia Vianna Maurer Morelli</i>	
Review Article / Artigo de Revisão	
Early life seizures and their long-term impacts on cognition: the role of synaptic plasticity dysfunctions as an underlying mechanism / Crises na infância e o impacto a longo prazo sobre a cognição: o papel das disfunções da plasticidade sináptica como um mecanismo subjacente	114
<i>Rafael Naime Ruggiero, Cleiton Lopes Aguiar, João Pereira Leite</i>	
Influências do ambiente sobre a susceptibilidade às crises epiléticas: as lições dos modelos experimentais / Environment influence over epileptic seizure susceptibility: the lessons from experimental models	121
<i>Eduardo Henrique de Lima Umeoka, Victor Rodrigues Santos, Norberto Garcia-Cairasco</i>	
Imagem por fontes eletroencefalográficas – uma revisão sistemática sobre sua acurácia na determinação da zona epileptogênica em pacientes com epilepsia focal refratária / EEG source imaging – a systematic review about its accuracy in defining the epileptogenic zone in patients with refractory focal epilepsy	128
<i>Danilo Maziero, Marcio Sturzbecher, Carlos E. G. Salmon, Tonicarlo R. Velasco</i>	
Courses, Symposia & Seminars / Cursos, Simpósios & Seminários	132
Guidance for Authors / Normas para Autores	133

Liga Brasileira de Epilepsia – 2010-2012

Presidente

Luciano De Paola, Curitiba/PR

Tesoureiro

Carlos Eduardo Soares Silvado, Curitiba/PR

Secretário

Sergio Antoniuk, Curitiba/PR

Secretária Executiva

Maria Luiza G. de Manreza, São Paulo/SP

Endereço (Diretoria Executiva)

Liga Brasileira de Epilepsia
Rua Teodoro Sampaio, 741 cj. 94 – Fone/Fax: (11)3085-6574
CEP 05405-050 – São Paulo – SP

Conselho Fiscal

Elza Márcia Yacubian, São Paulo/SP
Wagner Afonso Teixeira, Brasília/DF
Lauro Wichert-Ana, Ribeirão Preto/SP
Luiz Athaide Jr., Recife/PE
Carlos Silvado, Curitiba/PR

Conselho Consultivo

Wagner Afonso Teixeira (Presidente LBE 2008-2010)
Fernando Cendes (Presidente LBE 2006-2008)
Magda Lahorgue Nunes (Presidente LBE 2004-2006)
Américo C. Sakamoto (Presidente LBE 2002-2004)
Carlos Silvado (Presidente LBE 2000-2002)

Comissão Aspectos Legais

Carlos Silvado, Curitiba/PR (Coordenador)
Kette Valente, São Paulo/SP
Carlos Campos, São Paulo/SP
Luiz Athaide Jr., Recife/PE
Lauro Wichert-Ana, Ribeirão Preto/SP

Comissão Científica

João Pereira Leite, São Paulo (Coordenador)
Jaderson Costa da Costa, Porto Alegre/RS
Norberto Garcia Cairasco, Ribeirão Preto/SP
Luis Eugênio Mello, São Paulo/SP
Fernando Cendes, Campinas/SP

Comissão de Neuropsicologia

Mirna Portuguese, Porto Alegre/RS (Coordenadora)
Sabine Marroni, Porto Alegre/RS
Daniel Fuentes, São Paulo/SP
Maria Joana Mader, Curitiba/PR
Andréa Alessio, Campinas/SP

Comissão Tratamento Cirúrgico da Epilepsia

Carlos Silvado, Curitiba/PR (Coordenador)
Américo Sakamoto, Ribeirão Preto/SP
André Palmieri, Porto Alegre/RS
Luciano de Paola, Curitiba/PR
Luis Henrique Martins Castro, São Paulo/SP
Elisana Garzon, São Paulo/SP

Comissão de Drogas Antiepilépticas (DAES)

Veriano Alexandre Jr., Ribeirão Preto/SP (Coordenador)
Carlos Guerreiro, Campinas/SP
Elza Márcia Yacubian, São Paulo/SP
Maria Luiza Manreza, São Paulo/SP

Comissão Epidemiologia Clínica

Marleide da Mota Gomes, Rio de Janeiro (Coordenadora)
Li Li Min, Campinas/SP
Moacir Alves Borges, São José do Rio Preto/SP
Valentina Carvalho, Recife/PE

Comissão Epilepsia na Infância

Magda Lahorgue Nunes, Porto Alegre/RS (Coordenadora)
Rosa Valério, São Paulo/SP
Aurea Nogueira de Mello, Natal/RN
Marilisa Guerreiro, Campinas/SP
Kette Valente, São Paulo/SP

Comissão de Neurofisiologia Clínica

Regina Maria Fernandes, Ribeirão Preto/SP (Coordenadora)
Andrea Julião de Oliveira, Belo Horizonte/MG
Vera Cristina Terra, Ribeirão Preto/SP
Carlos Silvado, Curitiba/PR
Jaderson Costa da Costa, Porto Alegre/RS

Comissão de Ensino

Li Li Min, Campinas/SP (Coordenador)
Lucas Vilas Boas Magalhães
Paula T. Fernandes, Campinas/SP

Comissão Revista de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica

Fernando Cendes, Campinas/SP (Editor)

Capítulos da LBE – Biênio 2010-2012

Capítulo da Bahia

Presidente: Marielza Fernández Veiga
Secretária: Camila Souza Alves Cosmo
Tesoureiro: Francisco Monteiro Meneses

Capítulo do Distrito Federal/Goiás

Presidente: Wagner Afonso Teixeira
Secretário: Francisco Arruda
Tesoureiro: Paulo Ragazzo

Capítulo de Minas Gerais

Presidente: Maria Carolina Doretto
Secretaria: Andréa Julião de Oliveira
Tesoureiro: Luiz Fernando Fonseca

Capítulo de Paraná

Presidente: Luciano De Paola
Secretário: Carlos Silvado
Tesoureiro: Sergio Antoniuk

Capítulo de Pernambuco

Presidente: Adélia Henriques Souza
Secretária: Valentina Nicole Carvalho
Tesoureiro: Ricardo Amorim

Capítulo do Rio de Janeiro

Presidente: Eduardo de Sá Campello Faveret
Secretaria: Heloisa Viscaíno F. S. Pereira
Tesoureira: Rosiane da Silva Fontana

Capítulo do Rio Grande do Sul

Presidente: Marta Hemb
Secretária: Alessandra Marques Pereira
Tesoureira: Danielle Irigoyen da Costa

Capítulo de Santa Catarina

Presidente: Katia Lin
Secretária: Lucia Sukys Claudino
Tesoureira: Maria Alice Horta Bicalho

Capítulo de São Paulo

Presidente: Regina Maria França Fernandes
Secretária: Vera Cristina Terra
Tesoureiro: Lauro Wichert-Ana

WEBSITE:

<http://www.epilepsia.org.br/epi2002/capitulos.asp>

Esta edição do JECN apresenta quatro artigos importantes. Primeiro uma análise genética em cérebros de *zebrafish*, em modelo de crises induzidas por pentilenotetrazol, mostra que a indução de crise epilética altera o padrão de transcrito do gene BDNF no cérebro do *zebrafish* como observado em outros modelos e em humanos, porém em um padrão temporal diferente. Este estudo contribui para a caracterização deste pequeno peixe como um modelo de estudo em epilepsias.

O trabalho de Ruggiero e colaboradores discute o impacto em longo prazo das crises epiléticas na cognição e o papel da plasticidade sináptica neste contexto. O terceiro trabalho, de Umeoka e colaboradores, apresenta uma revisão sobre estudos experimentais na susceptibilidade às crises epiléticas e as influências ambientais.

Por último, Maziero e colaboradores apresentam uma revisão sistemática sobre sua acurácia na determinação da zona epileptogênica em pacientes com epilepsia focal refratária.

Boa leitura a todos.

Fernando Cendes
Editor, JECN

Message of the President of the Brazilian League of Epilepsy

P rezados colegas,

Entre as várias frentes de trabalho da Liga Brasileira de Epilepsia chama atenção a participação na elaboração do Plano Estratégico e de Ação para Epilepsia das Américas e Caribe, uma ação conjunta incluindo Ministério da Saúde, ASPE-Brasil, EPI-Brasil, ABE, DC de Epilepsia da ABN e Sociedade Brasileira de Medicina da Família e Comunidade. O grupo de trabalho reunir-se-á em Brasília, em 21 de fevereiro de 2013, visando o delineamento preliminar da linha de cuidado em atendimento de epilepsia. Essas ações, esperançosamente, motivarão a criação de um portal, sob administração do Ministério da Saúde, visando um melhor atendimento às pessoas com epilepsia, da área básica ao nível terciário. A expectativa atual é da conclusão desta ação até agosto de 2013, culminando com o Dia Nacional da Epilepsia.

Nosso agradecimento preliminar e o reconhecimento aos colegas envolvidos neste esforço. Oportunamente outras informações sobre o desenvolvimento deste e outros trabalhos associados à corrente gestão da LBE.

Atenciosamente,

Luciano De Paola

Presidente da Liga Brasileira de Epilepsia
Gestão 2012-2014

Análise Temporal dos Transcritos dos Genes *bdnf* e *ntkr2* em Cérebro de Zebrafish Induzido à Crise Epiléptica por Pentilenotetrazol

Fernanda Christina Reis-Pinto, Patrícia Gonçalves Barbalho, Rafael Felipe Pires Mangolin, Cláudia Vianna Maurer-Morelli

Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

RESUMO

Objetivo: Investigar o perfil temporal de transcritos dos genes *bdnf*, *ntkr2a* e *ntkr2b* em cérebro de *zebrafish* após crise epiléptica induzida por Pentilenotetrazol (PTZ). **Metodologia:** Os animais foram divididos em Grupo PTZ (induzidos à crise epiléptica com PTZ 15mM) e Grupo Controle (animais sem crise epiléptica) e seus cérebros coletados nos tempos: 0h, 12h, 24h, 48h, 72h pós-crise. Reações de transcriptase reversa-PCR quantitativa foram realizadas com os controles endógenos *18s* e *ef1a* usando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, Foster City). A quantificação relativa foi calculada pela equação $QR=2^{-\Delta\Delta CT}$ e a significância estatística dada pelo teste Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$). **Resultados:** No grupo PTZ houve um aumento significativo dos níveis de RNAm do gene *bdnf* no tempo 0h ($p=0,017$). O aumento de transcritos encontrado nos outros tempos não foi significativo ($p > 0,05$). **Conclusão:** Nossos resultados mostraram que a indução de crise epiléptica alterou o padrão de transcrito do gene *bdnf* no cérebro do *zebrafish* como visto em outros modelos animais e em humanos, porém em um padrão temporal diferente. Este é o primeiro estudo que descreve o perfil temporal de transcritos *bdnf/ntkr2* em cérebro de *zebrafish* após crise epiléptica e contribui para a caracterização deste pequeno peixe como modelo de estudo em epilepsias.

Unitermos: epilepsia; *zebrafish*; *bdnf*; Pentilenotetrazol e PCR quantitativa.

ABSTRACT

Temporal transcript profile of bdnf, ntrk2a and ntrk2b genes in zebrafish brain after Pentilenotetrazole (PTZ)-induced seizure

Objective: The main aim of this study was to investigate the transcript profile of *bdnf*, *ntkr2a* and *ntkr2b* genes in adult zebrafish brain after Pentilenotetrazole (PTZ)-induced seizure. **Methods:** Zebrafish were separated in PTZ (seizure-induced) and Control (no seizure) groups. At 0h, 12h, 24h, 48h and 72h after seizure, animals were anesthetized and their brains were immediately collected for RNA extraction. Reverse transcriptase quantitative-PCRs were carried out with *18S* and *ef1a* as endogenous control using TaqMan™ System (Applied Biosystems, Foster City). The relative quantification was calculated by the equation $RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test ($p \leq 0.05$). **Results:** Comparisons between both groups showed an increase of *bdnf* mRNA levels in the PTZ group at 0h after seizure ($p=0.017$). No statistical significance was found in other times investigated ($p > 0.05$). **Conclusions:** Our results showed an up-regulation of the transcript levels of *bdnf* gene in zebrafish brain after seizure as seems in other models and humans, but in a different pattern. This is the first study investigating temporal pattern of *bdnf*, *ntkr2a* and *ntkr2b* genes in zebrafish brain after a seizure and contributes to characterize it as a model for epilepsy studies.

Keywords: epilepsy; zebrafish; *bdnf*; Pentilenotetrazole and quantitative PCR.

INTRODUÇÃO

O uso de modelos animais tem trazido grandes benefícios para uma maior compreensão das doenças humanas, inclusive as epilepsias. Dentro deste contexto, o *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish* ou peixe paulistinha, tem se estabelecido como um modelo promissor no estudo das epilepsias, mas ainda pouco explorado.

Como vertebrado, o *zebrafish* possui diversos processos biológicos comparáveis aos mamíferos tais como: desenvolvimento, conservada organização de órgãos e tecidos (incluindo o sistema nervoso), fisiologia, comportamento e genoma¹⁻⁴. Em relação ao genoma, o *zebrafish* possui 80% de homologia com o genoma humano, além de conservada sintenia^{2,5,6}. É importante destacar que o genoma deste peixe sofreu duplicação parcial de aproximadamente 20% de seus genes^{1,7,8}. Esse fato faz com que estudos genéticos neste animal devam levar em consideração a investigação de ambas as cópias quando o gene de interesse estiver duplicado.

Devido às suas características, o *zebrafish* foi recentemente proposto como um modelo para estudos das epilepsias⁹. No estudo de Baraban e colaboradores (2005), larvas de *zebrafish* com 7 dias pós-fertilização foram quimicamente induzidas à crises epiléticas por Pentilenotetrazol (PTZ) na concentração 15mM e, investigados o comportamento, a atividade neural, os níveis de RNAm do gene *c-fos* (um conhecido marcador de atividade neuronal) e a supressão dos padrões eletrográficos por drogas antiepiléticas⁹. Depois desta descrição, o modelo do *zebrafish* também tem sido usado para manipulações de genes candidatos para as epilepsias, fazendo dele um modelo promissor para o estudo dessas condições¹⁰⁻¹².

Apesar destas publicações, pouco se sabe sobre as alterações que ocorrem no cérebro do *zebrafish* após a indução de crises epiléticas. As investigações de eventos já conhecidos e descritos em outros modelos animais de epilepsia certamente contribuem para uma melhor caracterização do *zebrafish* como modelo de epilepsia *per se* e melhora a interpretação de dados obtidos por meio deste organismo. Diferentes estudos mostraram um aumento nos níveis de transcritos e protéicos do *BDNF* (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) e seu receptor *TRKB* (do inglês *Tropomyosin-related kinase type B*) em modelos animais de epilepsia¹³.

O *BDNF* faz parte da família das neurotrofinas e está bem estabelecido o seu papel durante o desenvolvimento através da promoção da sobrevivência e diferenciação neuronal, além de regular a transmissão e a plasticidade sináptica em adultos, contribuindo com vários processos neuronais adaptativos bem como doenças no sistema ner-

voso central (SNC)^{14,15}. De fato, o *BDNF* parece ser parte de um mecanismo de modificação de sinapses no SNC que está implicado na cascata de mudanças comportamentais e eletrofisiológicas que permeiam o estado epilético^{16,17}. Apesar dos estudos em outros modelos de epilepsia, não há relatos sobre o padrão de expressão das neurotrofinas pós-criises epiléticas em *zebrafish*. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi investigar o perfil temporal de transcritos dos genes *bdnf*, *trk2a* e *trk2b* após crise epilética induzida por PTZ.

METODOLOGIA

Manutenção e tratamento dos animais

Os peixes adultos foram adquiridos em lojas convencionais e passaram por um período de quarentena em aquários com uma população máxima de três peixes por litro de água, antes de serem usados na experimentação. As condições de manutenção e cuidados foram em acordo com Westerfield¹⁸.

Para a experimentação, os animais foram divididos em dois grupos: (i) PTZ – animais induzidos à crise epilética pelo agente convulsivante PTZ e (ii) CNT – animais controle sem crise epilética. Animais do grupo PTZ foram transferidos individualmente para um *becker* de vidro contendo 15mM de PTZ em volume final de 200ml por 2-3 minutos e observadas as três fases comportamentais descritas por Baraban e colaboradores⁹. É importante salientar que foram considerados na experimentação, somente os animais que apresentaram as três fases comportamentais já estabelecidas⁹. Os animais do grupo CNT foram submetidos à mesma manipulação, mas em água livre de PTZ. Após a manipulação, os animais foram colocados em aquários livres de PTZ, de acordo com seu grupo de estudo (PTZ ou CNT). Nos tempos zero (0h), 12h, 24h, 48h e 72h pós-crise epilética (PTZ) ou pós-manipulação (CNT), os animais foram crioadestesiados e seus cérebros coletados para a investigação de transcritos por PCR em Tempo Real. Cada tempo de investigação foi composto por um n=3 (6 cérebros). Um *pool* de dois cérebros foi usado para compor uma amostra. Devido a heterogeneidade entre os animais, um segundo conjunto independente de animais também foi dividido em grupo PTZ e CNT (nomeado de experimento 2) e manipulados da mesma forma que o primeiro (nomeado de experimento 1). Portanto, neste estudo foram realizados dois conjuntos independentes para o mesmo tratamento e aquisição de cérebros. Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNICAMP.

Análise molecular dos genes *bdnf* e *ntkr2*

A extração do RNA total do cérebro de todos os animais foi realizada pelo método TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante (1ml do reagente para cada 100mg de tecido). A concentração do RNA total extraído de cada amostra foi medida por espectroscopia em equipamento NanoVue (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e a qualidade do RNA checada por eletroforese em gel de agarose. Foi empregada a técnica da transcriptase reversa-PCR quantitativa (RT-qPCR) usando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, Foster City) em equipamento de Real Time 7500 (Applied Biosystems, Foster City) para a análise do perfil de transcritos dos genes *bdnf*, *ntkr2a* e *ntkr2b*. As corridas foram em triplicatas usando os genes *18S* e *ef1a* como controles endógenos. A quantificação relativa (QR) foi determinada pela equação $QR = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ ¹⁹ e para a análise de significância do perfil dos transcritos foi empregado o

teste de *Kruskal-Wallis*, sendo considerado significativo um $p \leq 0,05$. Para a confecção dos gráficos das Figuras 1 e 2 foi considerada a média dos valores do QR ($QR_{méd}$) e as barras de erro dadas pelos valores QR máximo ($QR_{max} - QR_{méd}$) e QR mínimo ($QR_{méd} - QR_{min}$).

RESULTADOS

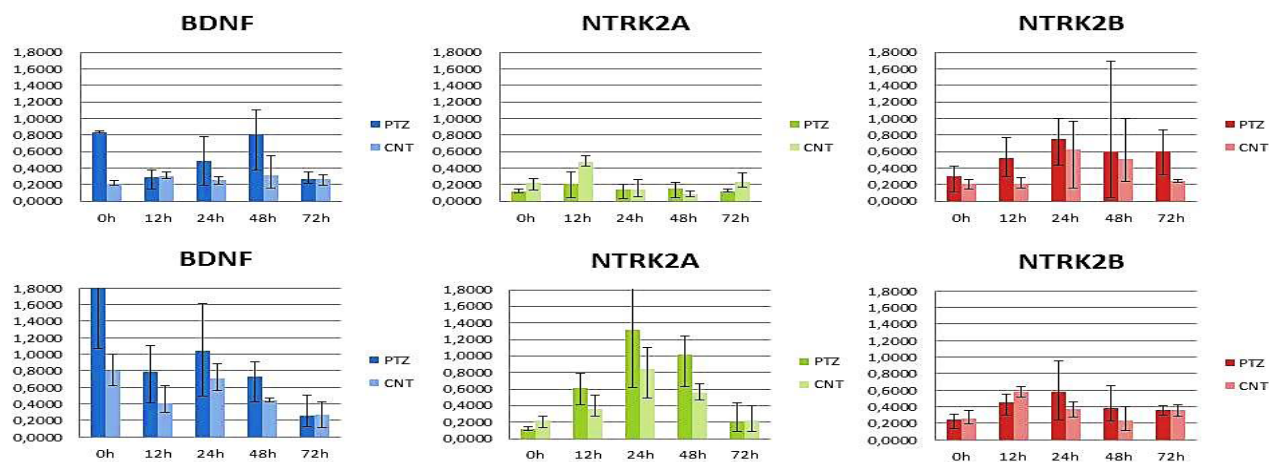
Os peixes adultos foram expostos por um período de 2-3 minutos ao PTZ 15mM e observada as três fases da crise epiléptica descritas em larvas por Baraban e colaboradores⁹, resumidamente: (i) Fase 1 - aumento da atividade do nado; (ii) Fase 2 - movimentos vigorosos, circulares e verticais; (iii) Fase 3 - movimentos estereotipados mimetizando crise tônico-clônica com posterior perda de postura. As médias da quantificação relativa obtidas com a análise dos transcritos para cada gene e tempo de ambos os conjuntos de experimentação (experimento 1 e 2) estão resumidos nas Tabelas 1 e 2:

Tabela 1. Média da quantificação relativa (QR) dos genes *bdnf*, *ntkr2a* e *ntkr2b* para o controle endógeno *18S* nos diferentes tempos pós crise epiléptica induzida por PTZ.

Gene	Tempo	Grupo	Experimento 1			Experimento 2		
			QR média	QR mín	QR máx	QR média	QR mín	QR máx
<i>bdnf</i>	0h	PTZ	0,832	0,007	0,013	2,993	1,922	3,034
		CNT	0,214	0,02	0,037	0,795	0,172	0,205
	12h	PTZ	0,289	0,148	0,089	0,792	0,383	0,310
		CNT	0,307	0,031	0,044	0,409	0,110	0,206
	24h	PTZ	0,487	0,29	0,292	1,042	0,550	0,569
		CNT	0,256	0,048	0,045	0,704	0,146	0,178
	48h	PTZ	0,808	0,428	0,298	0,734	0,314	0,174
		CNT	0,320	0,166	0,233	0,438	0,015	0,027
	72h	PTZ	0,266	0,055	0,091	0,252	0,130	0,254
		CNT	0,263	0,075	0,057	0,264	0,155	0,157
	0h	PTZ	0,122	0,021	0,023	0,122	0,021	0,023
		CNT	0,220	0,089	0,048	0,220	0,089	0,048
<i>ntkr2a</i>	12h	PTZ	0,207	0,158	0,147	0,608	0,199	0,180
		CNT	0,475	0,047	0,071	0,360	0,090	0,173
	24h	PTZ	0,138	0,104	0,071	1,316	0,700	0,601
		CNT	0,138	0,081	0,125	0,849	0,355	0,252
	48h	PTZ	0,147	0,107	0,079	1,021	0,387	0,223
		CNT	0,086	0,030	0,042	0,560	0,090	0,105
	72h	PTZ	0,123	0,012	0,019	0,204	0,117	0,232
		CNT	0,239	0,070	0,110	0,217	0,128	0,183
	0h	PTZ	0,243	0,107	0,066	0,122	0,021	0,023
		CNT	0,253	0,055	0,106	0,220	0,089	0,048
	12h	PTZ	0,453	0,159	0,100	0,608	0,199	0,180
		CNT	0,577	0,056	0,062	0,360	0,090	0,173
<i>ntkr2b</i>	24h	PTZ	0,575	0,337	0,382	1,316	0,700	0,601
		CNT	0,367	0,090	0,094	0,849	0,355	0,252
	48h	PTZ	0,388	0,163	0,265	1,021	0,387	0,223
		CNT	0,232	0,120	0,166	0,560	0,090	0,105
	72h	PTZ	0,360	0,058	0,052	0,204	0,117	0,232
		CNT	0,357	0,068	0,066	0,217	0,128	0,183

Tabela 2. Média da quantificação relativa (QR) dos genes *bdnf*, *ntrk2a* e *ntrk2b* para o controle endógeno *ef1a* nos diferentes tempos pós crise epiléptica induzida por PTZ.

Gene	Tempo	Grupo	Experimento 1			Experimento 2		
			QR média	QR mín	QR máx	QR média	QR mín	QR máx
<i>bdnf</i>	0h	PTZ	1,352	0,369	0,229	0,251	0,062	0,072
		CNT	0,247	0,049	0,047	0,312	0,143	0,256
	12h	PTZ	0,429	0,168	0,087	0,183	0,050	0,053
		CNT	0,158	0,044	0,085	0,131	0,038	0,054
	24h	PTZ	0,871	0,323	0,274	0,248	0,041	0,060
		CNT	0,604	0,447	0,270	0,296	0,049	0,066
	48h	PTZ	0,639	0,385	0,724	0,217	0,043	0,056
		CNT	0,800	0,280	0,200	0,218	0,070	0,088
	72h	PTZ	0,628	0,292	0,417	0,163	0,037	0,052
		CNT	0,243	0,009	0,011	0,193	0,069	0,041
<i>ntrk2a</i>	0h	PTZ	0,255	0,027	0,026	0,313	0,053	0,062
		CNT	0,322	0,058	0,033	0,490	0,263	0,510
	12h	PTZ	0,327	0,092	0,068	0,198	0,072	0,042
		CNT	0,313	0,072	0,101	0,154	0,047	0,059
	24h	PTZ	0,282	0,019	0,032	0,417	0,073	0,070
		CNT	0,285	0,074	0,074	0,462	0,133	0,076
	48h	PTZ	0,113	0,049	0,081	0,405	0,093	0,091
		CNT	0,301	0,048	0,040	0,373	0,157	0,151
	72h	PTZ	0,367	0,143	0,081	0,167	0,054	0,078
		CNT	0,288	0,050	0,059	0,204	0,071	0,092
<i>ntrk2b</i>	0h	PTZ	0,302	0,185	0,125	0,165	0,093	0,105
		CNT	0,206	0,061	0,051	0,330	0,167	0,326
	12h	PTZ	0,522	0,224	0,243	0,126	0,056	0,035
		CNT	0,208	0,049	0,077	0,114	0,064	0,044
	24h	PTZ	0,747	0,316	0,249	0,159	0,024	0,026
		CNT	0,623	0,465	0,341	0,155	0,044	0,026
	48h	PTZ	0,595	0,551	1,091	0,138	0,021	0,026
		CNT	0,505	0,263	0,495	0,110	0,042	0,037
	72h	PTZ	0,604	0,287	0,263	0,106	0,049	0,052
		CNT	0,240	0,011	0,018	0,124	0,043	0,057

**Figura 1.** Análise dos transcritos dos genes *bdnf*, *ntrk2a* e *ntrk2b* em cérebro adulto de zebrafish em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por Pentilenotetrazol comparado com o grupo controle (sem crise epiléptica). Os genes alvos foram normalizados com o controle endógeno *18S*. Na linha superior, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e na linha inferior, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. Cada tempo é representado por um n=3 (6 cérebros). O eixo y é a média dos valores da quantificação relativa (QR) e as barras de erro representam os valores de $QR_{\min/\max}$.

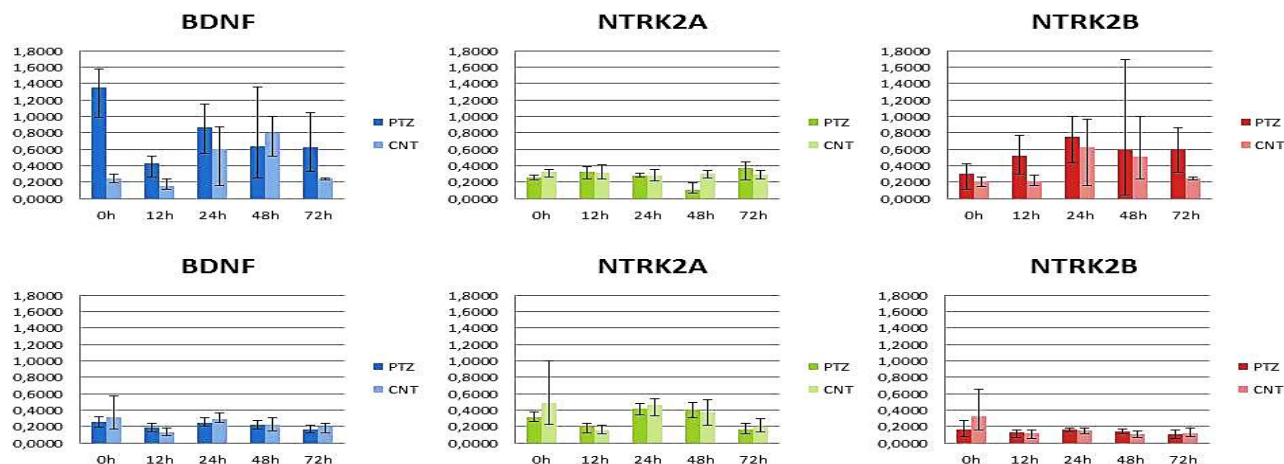


Figura 2. Análise dos transcritos dos genes *bdnf*, *nrk2a* e *nrk2b* em cérebro adulto de zebrafish em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por Pentilenotetrazol comparado com o grupo controle (sem crise epiléptica). Os genes alvos foram normalizados com o controle endógeno *ef1a*. Na linha superior, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e na linha inferior, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. Cada tempo é representado por um n=3 (6 cérebros). O eixo y é a média dos valores da quantificação relativa (QR) e as barras de erro representam os valores de $QR_{\min/\max}$.

Na visualização gráfica destes resultados (Figuras 1 e 2) pode-se observar um aumento dos transcritos do gene *bdnf* no grupo PTZ em comparação ao grupo CNT no tempo 0h ($p = 0.017$) após as crises epilépticas, mas, se comparados com os receptores *nrk2a* e *nrk2b*, os mesmos não acompanham esse aumento. Nos tempos 12h, 24h e 48h é possível ver que há um aumento dos níveis de RNAm do gene *bdnf* e seus receptores no grupo PTZ, mas que não foi estatisticamente significativo ($p > 0.05$). Nenhuma diferença de aumento foi encontrado no tempo 72h entre ambos os grupos.

DISCUSSÃO

A sinalização *BDNF/NTRK2* tem sido implicada na epileptogênese²⁰, assim como o aumento dos níveis de RNAm e protéicos destas neurotrofinas após crise epiléptica tem sido descrito em diferentes modelos animais¹³. No entanto, o impacto de crises epilépticas sobre o perfil de transcritos dos genes *bdnf* e *nrk2* no cérebro do zebrafish ainda não é conhecido.

Porque o gene *nrk2* é duplicado no zebrafish, neste estudo foram investigados ambos os genes, *nrk2a* e *nrk2b*, pois os mesmos poderiam apresentar diferentes padrões de expressão^{7,10,11}. Nossos resultados apontam que após a indução de crise epiléptica há um aumento de transcrito em ambos os genes (Figuras 1 e 2), mas indicando que há um aumento preferencial do gene *nrk2b* (Figuras 1 e 2; Tabelas 1 e 2).

Os resultados obtidos com esse estudo apontam um aumento do RNAm do gene *bdnf* logo após a indução da

crise, no tempo 0h ($p = 0.017$) porém os seus receptores *nrk2a* e *nrk2b* não tiveram o mesmo nível de RNAm neste mesmo tempo ($p \geq 0.05$). No entanto, 12h após a indução da crise epiléptica pode-se observar um aumento de RNAm desses receptores (Figuras 1 e 2).

O receptor *NTRK2*, quando ativado pelo *BDNF*, fosforila vias de sinalização de diferenciação e sobrevivência celular e plasticidade^{16,21,22}. O papel do *BDNF* e *NTRK* nas epilepsias ainda é controverso^{23,24}, mas é inquestionável que o padrão de expressão de transcritos e protéicos estão aumentados tanto em espécimes cirúrgicos de pacientes com refratariedade medicamentosa, quanto em diferentes modelos animais de epilepsia²⁴⁻³⁰. Distribuído amplamente no cérebro de roedores adultos, o *BDNF* apresenta níveis mais altos em estruturas associadas com a epilepsia e a plasticidade sináptica, como a formação hipocampal¹⁶. Em ratos, quatro dias após a administração intracerebroventricular de ácido cáínico houve um aumento de 179% nos níveis de *BDNF* no hipocampo desses animais. Esse valor diminuiu 98% em 45 dias e 37% em 120 dias após a administração do ácido cáínico²⁴. Em outro estudo, Garcia e colaboradores também usando o modelo de ácido cáínico em ratos, mostraram por hibridização *in situ* um aumento do *BDNF* nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo uma semana após a injeção do ácido cáínico, e principalmente, um aumento dessa neurotrofina na camada de células granulares do giro denteado, duas semanas após a injeção do ácido cáínico³⁰.

O aumento estimulado por crise epiléptica com retorno escalonado até aos níveis basais, também pode ser visto no perfil obtido em nosso estudo, ainda que o tempo de

ocorrência seja diferente, revelando-se muito mais curto no caso do peixe (Figuras 1 e 2). O que nos chamou a atenção foi que o padrão do RNAm do *bdnf* tenha tido uma resposta tão intensa no tempo 0h ($p=0,017$), evidenciando um tempo diferente de resposta entre *bdnf* e os receptores *ntkr2* no *zebrafish*. No entanto, é interessante destacar que uma hipótese a ser investigada é a possibilidade de outro receptor com afinidade para o *bdnf* estar aumentando neste momento (tempo 0h), como por exemplo o $p75^{\text{NTR}}$ (*p75 neurotrophin receptor*). Nesse estudo não investigamos o gene $p75^{\text{NTR}}$, mas foi descrito que a expressão deste gene está aumentada em cérebro de rato logo após a indução de crises epiléticas por pilocarpina e que este receptor possivelmente sinaliza vias de apoptose³¹. Apesar da forma madura do BDNF ter baixa afinidade pelo receptor $p75^{\text{NTR}}$, esta poderia ser uma via de ação para o *bdnf* neste tempo 0h,³² mostrando um padrão mais complexo de interação entre neurotrofinas e seus receptores³³.

A indução de crise no grupo PTZ também aumentou os níveis dos transcritos dos genes *bdnf* e *ntkr2b* nos outros tempos investigados, mas esses valores não foram estatisticamente significantes ($p \geq 0,05$). É importante ressaltar que apesar do número de amostras ser representativo (06 cérebros por tempo em cada experimento independente) é possível observar que há variação (representada pelas barras de erro nas Figuras 1 e 2) entre as amostras do mesmo grupo e tempo. Este fator poderia ser o motivo das diferenças não terem sido estatisticamente significantes, apesar do visível aumento dado pelos valores da média da quantificação relativa (Tabelas 1 e 2). Desta forma, poderíamos chamar a atenção e destacar que estudos envolvendo animais adultos fornecidos comercialmente devam aumentar seu tamanho amostral, a fim de minimizar essa variação. Em nosso estudo, além de usarmos dois controles endógenos para a normalização da RT-qPCR, realizamos uma segunda bateria de experimentos (experimento 2) com um grupo independente de animais, que confirmaram os resultados obtidos previamente. Por causa dessa variação, consideramos os dados que foram iguais em pelo menos três, dos quatro resultados obtidos (experimentos 1 e 2 para ambos os controles endógenos). As pequenas diferenças entre o experimento 1 e 2 se devem, provavelmente ao fato dos peixes serem de épocas de quarentenas diferentes.

Este estudo não teve a intenção de responder qualquer controvérsia em relação ao papel das neurotrofinas na epileptogênese, mas sim, verificar se a indução de crise epilética poderia alterar os níveis de transcrito do *bdnf* e seus receptores *ntkr2* no cérebro do *zebrafish* adulto, como é visto em outros modelos animais. Nossos resultados mostraram que embora temporalmente mais curto, o *zebrafish* apresenta uma elevação dos níveis do *bdnf* como visto em outros modelos de epilepsia, mas com um pico de expressão no tempo 0h^{24,30}. Este é o primeiro estudo

que descreve o perfil temporal de transcritos dos genes *bdnf*, *ntkr2a* e *ntkr2b* pós crise epilética e contribui para a caracterização do *zebrafish* como modelo para estudos das epilepsias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro recebido para o desenvolvimento deste estudo: CNPq – processo 475405/2010-2, FAEPEX-PAPDIC – processo 17811.

REFERÊNCIAS

1. Shin JT and Fishman MC. From zebrafish to human: modular medical models. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2002;3: 311-40.
2. Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD and Johnson SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Research* 2000;10(9):1351-8.
3. Dooley K and Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics and Development* 2000;10:252-6.
4. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B and Schilling TF. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamic* 1995;203:253-310.
5. Navratilova P and Becker TS. Genomic regulatory blocks in vertebrates and implications in human disease. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2009;8(4):333-42.
6. Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, Horne S, Amores A, Brownlie A, Donovan A, Egan ES, Force A, Gong Z, Goutel C, Fritz A, Kelsh R, Knapik E, Liao E, Paw B, Ransom D, Singer A, Thomson M, Abduljabbar TS, Yelick P, Beier D, Joly JS, Larhammar D, Rosa F, Westerfield M, Zon LI, Johnson SL and Talbot WS. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nature Genetics* 1998;18(4):345-9.
7. Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A and Talbot WS. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate Chromosomes. *Genome Research* 2000;10:1890-902.
8. Robinson-Rechavi M and Laudet V. Evolutionary rates of duplicate genes in fish and mammals. *Molecular Biology and Evolution* 2001; 18(4):681-3.
9. Baraban SC, Taylor MR, Castro PA and Baier H. Pentylentetrazole-Induced Changes in Peixe-zebra Behavior, Neural Activity and c-fos Expression. *Neuroscience* 2005;131(3):759-68.
10. Teng Y, Xie X, Walker S, Rempala G and Kozlowski DJ. Knockdown of zebrafish *Lgi1a* results in abnormal development, brain defects and a seizure-like behavioral phenotype. *Human Molecular Genetics* 2010; 19(22):4409-20.
11. Teng Y, Xie X, Walker S, Saxena M, Kozlowski DJ, Mumm JS and Cowell JK. Loss of Zebrafish *Lgi1b* Leads to Hydrocephalus and Sensitization to Pentylentetrazole Induced Seizure-Like Behavior. *PLoS One* 2011;6(9):e24596.
12. Hortopan GA, Dinday MT and Baraban SC. Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. *Disease Models & Mechanisms* 2010;3(3-4):144-8.
13. Binder DK. The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2004;548:34-56.
14. Huang EJ and Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual Review Neuroscience* 2001; 24:677-736.
15. Bekinschtein P, Cammarota M, Kathe C, Slipczuk L, Rossato JJ, Goldin A, Izquierdo I and Medina JH. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Science* 2008;105(7):2711-6.

16. Binder DK and Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 2004;22:123-31.
17. Kokaia M, Ernfors P, Kokaia Z, Elmér E, Jaenisch R and Lindvall O. Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice. *Experimental Neurology* 1995;133(2):215-24.
18. Westerfield M. *The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (Danio rerio)*. 4. ed. Eugene (OR): University of Oregon, Institute of Neuroscience; 2000.
19. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
20. Heinrich C, Lähteenen S, Suzuki F, Anne-Marie L, Huber S, Häussler U, Haas C, Larmet Y, Castren E and Depaulis A. Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease* 2011;42(1):35-47.
21. Barde YA. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Progress in Clinical and Biological Research* 1994;390:45-56.
22. Ueyama T, Kawai Y, Nemoto K, Sekimoto M, Toné S and Senba E. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neuroscience Research* 1997;28(2):103-10.
23. Binder DK, Croll SD, Gall CM and Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Growth Factors* 2004;22(3):123-31.
24. Shetty AK, Zaman V and Shetty GA. Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting. *Journal of Neurochemistry* 2003;87(1):147-59.
25. Mathern GW, Babb TL, Micevych PE, Blanco CE and Pretorius JK. Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Molecular and Chemical Neuropathology* 1997;30:53-76.
26. Koyama R and Ikegaya Y. To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus. *The Neuroscientist* 2005;11:282-7.
27. Lahtinen S, Pitkanen A, Saarelainen T, Nissinen J, Koponen E and Castren E. Decreased BDNF signalling in transgenic mice reduces epileptogenesis. *European Journal Neuroscience* 2002;15:721-34.
28. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL and Croll SD. Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Experimental Neurology* 2002;174:201-14.
29. Hortopan GA and Baraban SC. Aberrant expression of genes necessary for neuronal development and Notch signaling in an epileptic mind bomb zebrafish. *Developmental Dynamics* 2011;240(8):1964-76.
30. Garcia ML, Garcia VB, Isackson PJ and Windebank AJ. Long-term alterations in growth factor mRNA expression following seizures. *NeuroReport* 1997;8:1445-9.
31. Roux PP, Colicos MA, Barker PA and Kennedy TE. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *The Journal of Neuroscience* 1999;19(16):6887-96.
32. Holm MM, Nieto-Gonzalez JL, Vardya I, Vaegter CB, Nykjaer A and Jensen K. Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience* 2009;29(40):12412-8.

Endereço para correspondência:

Cláudia Vianna Maurer-Morelli
Departamento de Genética Médica – Faculdade de Ciências Médicas
Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil

Early Life Seizures and Their Long-term Impacts on Cognition: The Role of Synaptic Plasticity Dysfunctions as an Underlying Mechanism

Rafael Naime Ruggiero^a, Cleiton Lopes Aguiar^a, João Pereira Leite^{a,b}

Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Objective: Symptomatic seizures are frequent events during childhood. Previous studies indicate a relationship between these events and the onset of an epileptic condition. However long-term effects of seizures on neurocognitive function remain poorly understood. Our objective is to develop a conceptual framework linking key clinical and experimental findings with electrophysiological studies attempting to elucidate the mechanisms involved with early life seizures (ELS) outcome. **Methods:** In this review clinical and experimental studies were addressed to raise the main findings of the literature on ELS long-term consequences. To better understand the neural substrates of cognitive outcome of ELS we have reviewed electrophysiological studies in animals that addressed experimental forms of synaptic plasticity such as long-term potentiation, long-term depression and paired pulse facilitation (LTP, LTD and PPF) and oscillatory patterns in the hippocampus and the prefrontal cortex (PFC) that relate to behavioral and molecular alterations after ELS. **Results and conclusions:** Evidences from literature indicate that the immature brain may be not as resistant to seizure effects as previously thought. ELS increase hippocampal excitability, enhance the vulnerability to seizures in the adult, and modify the expression of GABA and glutamate receptors. Moreover ELS induce changes in h-channels and CB1 cannabinoid receptors. Frequent seizures during development produce impairment in learning and memory tasks, which relates to LTP impairment and LTD facilitation in the hippocampus. Apparently, frequent ELS could disrupt the molecular mechanisms implicated in synaptic plasticity induction. Studies also indicate the PFC as a key brain region involved in the behavioral and cognitive alterations of ELS. Future studies on ELS could evaluate a broader set of limbic regions and their plasticity mechanisms, contributing to a better understanding on psychiatric comorbidities of the epilepsies.

Keywords: early life seizures; synaptic plasticity; temporal lobe epilepsy; learning, memory; hippocampus; prefrontal cortex.

RESUMO

Crises na infância e o impacto a longo prazo sobre a cognição: o papel das disfunções da plasticidade sináptica como um mecanismo subjacente

Objetivo: Crises sintomáticas são eventos frequentes durante a infância. Estudos apontam para uma relação entre estes eventos e o início de uma condição epilética. Entretanto os efeitos de longo prazo das crises nas funções cognitivas permanecem pouco compreendidos. Nosso objetivo é desenvolver um arcabouço conceitual relacionando os principais achados clínicos e experimentais com estudos eletrofisiológicos na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos com as consequências das crises epiléticas durante a infância (CEDI). **Métodos:** Nessa revisão estudos clínicos e experimentais foram abordados levantando-se os principais achados da literatura sobre a evolução das CEDI. Para uma melhor compreensão dos substratos neurais envolvidos nos prejuízos cognitivos causados por CEDI nós revisamos estudos eletrofisiológicos em animais que investigaram formas experimentais de plasticidade sináptica como potenciação de longa duração, depressão de longa duração e

^a Ribeirão Preto Medical School, Department of Neurosciences and Behavior, University of São Paulo, Brazil.

^b Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), University of São Paulo.

Received December 01, 2012; accepted December 15, 2012.

facilitação por pulso pareado (LTP, LTD e PPF) e padrões oscilatórios no hipocampo e córtex pré-frontal (CPF) que se relacionam com alterações comportamentais e moleculares após CEDI. **Resultados e conclusões:** Evidências da literatura indicam que o cérebro imaturo pode não ser tão resistente aos efeitos das crises como se pensava anteriormente. CEDI aumentam a excitabilidade hipocampal, aumentam a vulnerabilidade a crises no adulto, e modificam a expressão de receptores GABA e glutamato. Além do mais CEDI induzem mudanças em canais-h e receptores canabinóides CB1. Crises frequentes durante o desenvolvimento produzem prejuízo em tarefas de aprendizado e memória que se relacionam a diminuição da LTP e facilitação da LTD no hipocampo. Aparentemente, CEDI frequentes podem interferir com os mecanismos moleculares implicados na indução de plasticidade sináptica. Estudos também indicam o CPF como uma região cerebral criticamente envolvida nas alterações comportamentais e cognitivas da CEDI. Estudos futuros em CEDI poderiam avaliar um conjunto mais amplo de regiões límbicas e seus mecanismos plásticos, contribuindo para um melhor entendimento das comorbidades psiquiátricas das epilepsias.

Unitermos: crise na infância; plasticidade sináptica; epilepsia do lobo temporal; aprendizado; memória; hipocampo; córtex pré-frontal.

INTRODUCTION

Epileptic seizures are the most common neurological emergency in childhood, affecting approximately 2-5% of children up to 5 years old¹⁻³. Among them, febrile seizures are the most frequent and can be divided into complex and simple¹. Complex febrile seizures are characterized by a prolonged duration (>15min), focal seizure onset or recurrent seizure within 24h. Simple febrile seizures, which make up 75% of the attacks, do not present these features². There is controversy whether these prolonged seizures can initiate a pathophysiologic process that would culminate in mesial temporal sclerosis¹. Besides the frequent history of a complex seizure in patients with epilepsy, only a small amount of the population who suffered ELS develops subsequent epilepsy^{2,4}. Also experimental studies have shown that immature rats do not present the classical neuronal loss and cell damage after episodes of provoked seizures found in adult animals^{2,5-8}. The aforementioned evidences contribute to the idea that the immature brain is more susceptible to seizure induction, although is more resistant to its consequences. However, recent experimental data have shown changes in molecular and neurotransmitter receptor expression possibly leading to enhanced hyperexcitation as a consequence of ELS⁹⁻¹². Also, there is controversy whether the ELS may have other neurological consequences such as cognitive impairment. Recent experimental findings have demonstrated the impact of ELS in hippocampal synaptic plasticity as a possible substrate of epileptogenic changes and cognitive deficits^{1,13,14}. A number of studies have connected neural plasticity with the pathophysiology of mental disorders like epilepsy, mood disorders and schizophrenia¹⁵⁻¹⁸. Current theories hypothesize that neuroplastic alterations during development may contribute to structural and functional changes in important circuits, which can drive long-lasting effects on adult brain function^{15,19}.

HUMAN STUDIES

The International League Against Epilepsy (ILAE) Commission on Classification and Terminology has recently revised concepts, terminologies, and approaches for classifying seizures and forms of epilepsy²⁰. One of the issues included was the abandonment of the designation “benign” epilepsies in childhood epilepsy. The argument against the term “benign” is based on a misleading interpretation of its consequences, which usually implies “no sequels left” to the patients and that has been recently challenged²¹.

Epidemiological studies have shown that the incidence of epilepsy is highest in early childhood; it is three-times higher in the first year of life than in mid-adulthood³. The course of seizure disorders in infancy and childhood ranges from transient to life-long, depending on the epilepsy syndrome, causes, and possibly treatment. The natural history of some epileptic syndromes may be time-limited; others might relapse, and others might persist into adulthood^{4,22}; and frequency of clinical seizures may not be directly associated with the severity of cognitive impairment^{23,24}.

Regarding, the relationship between early-life seizures (ELS) and the subsequent development of epilepsy or other long-term sequels remains highly controversial. Retrospective studies indicate that adults with temporal lobe epilepsy (TLE) frequently report having experienced childhood febrile or non-febrile status epilepticus (SE; defined as 30min of continuous epileptic seizure activity or two or more sequential seizures without full recovery of consciousness between seizures), which makes ELS a potential risk factor for the later development of epilepsy⁴. It also has been suggested that ELS may lead to long-term cognitive and social interaction impairments and might be associated with the progression of mesial temporal sclerosis^{4,22}. Moreover, it is not yet known whether ELS result in either permanent hippocampal damage or altered levels of excitation and inhibition that could be

predisposing factors for spontaneous seizures later in life. Animal models of ELS can eliminate factors such as prior brain injury, medication effects, and behavioral interactions that also impact learning ability. There is a body of evidence in rodents showing that ELS impact learning and memory in adulthood²⁵, which are associated with aberrant mossy fiber sprouting in the CA3 region, increased neurogenesis in the dentate gyrus, alterations of glutamate and GABA receptor expression and enhanced hippocampal excitability²⁵⁻²⁷.

ANIMAL MODELS

Several experimental protocols were developed to model seizures during development aiming to elucidate the epileptogenic mechanisms²⁸. In ELS models, seizures are induced in rodents at postnatal age less than 20 days old (<P20). Then, behavioral changes and susceptibility to further seizures are probed in the same animals in the adulthood. ELS have been studied by febrile seizures induction (increasing body temperature), SE induced by pharmacological stimulation with pilocarpine alone or combined with lithium (LI-PILO), kainic acid or pentylenetetrazol (PTZ), repeated convulsive seizures induced by flurothyl, and models of hypoxia^{2,6,29}.

ELS animal models do not exhibit the classical neuropathological findings of temporal lobe epilepsy (TLE) or those associated with SE in adult animals^{2,5-8}. Despite the lower threshold for generation of seizures in immature brains, developing animals are less vulnerable, in terms of damage and neuron loss than mature animals to a wide range of insults⁶. The behavioral consequences following SE are also dependent on the age of the animal by the time of SE. Adult animals submitted to ELS have higher mortality rate, significant memory, learning and behavioral impairments^{30,31}, neuronal loss and subtle neuronal plasticity^{6,32-36}. Likewise, spontaneous seizures are more likely to occur in adults who experienced SE than in young animals⁶. Younger rats (<P18) usually do not develop convulsive spontaneous seizures as a late consequence of SE³⁷. However, 90-120 days after ELS they show electrographic and behavioral alterations similar to those observed in rodent models of genetic absence epilepsy^{37,38}. In addition, animals subjected to multiple SE at P7 to P9 express several electroencephalographic disturbances³⁹; though rarely develop convulsive seizures or neuronal loss in limbic and neocortical structures³⁸. Several studies have also demonstrated that the immature brain (P10-P12) when exposed to febrile convulsions, but not followed by spontaneous seizures, are associated to hippocampal hyperexcitability in the adult^{9,10}. Therefore, the relationship between electrographic seizures and cognitive deficits in models of ELS is an important field to further investigations.

Animal models of febrile seizures are considered particularly important, because fever is the most prevalent cause of seizures in children^{2,4}. Experimental febrile seizures can be evoked in young rats at an age when the developing hippocampus is equivalent to those of human patients⁴⁰. In immature rats it was observed that hyperthermia causes seizures in almost all subjects, suggesting that genetic susceptibility is not a prerequisite for their generation⁴¹. Prolonged febrile seizures (~20min) in young rats produced changes in the cytoskeleton of hippocampal neurons that persists throughout weeks⁴². Using magnetic resonance imaging (MRI), 75% and 85% of animals have shown abnormal T2 signal in the hippocampus, piriform cortex and amygdala, 24h and 48h after febrile seizures, respectively⁴³. However, there was no cell death or neuronal injury suggesting that these changes are reversible⁴³. Despite the absence of pathological findings, adult animals submitted to febrile seizures during development have an increased excitability of hippocampal circuitry, increased susceptibility to induction of new and recurrent spontaneous seizures in a small amount of these animals⁴⁴. The underlying changes associated with increased hyperexcitability involve lasting changes at molecular and functional levels, including changes in h-channels and CB1 cannabinoid receptors on GABAergic interneurons of the hippocampus^{11,12,45}. Additionally, several studies indicate that hyperthermia-induced seizures promote changes in programs of gene expression of numerous molecules that regulate neuronal excitability and response of the neural network⁴¹. Altogether, the aforementioned data indicate that the immature rat brain may be not as resistant to SE-induced damage as previously thought, but probably more susceptible to activity-dependent plasticity leading to cognitive deficits associated to molecular and network reorganization underlying hippocampal hyperexcitability^{46,47}.

COGNITIVE DEFICITS

ELS are often associated with neurological dysfunctions that may persist in adults^{48,49}. In fact, the IQ of children with epilepsy tends to be lower compared with children without epilepsy^{50,51} and the number of children with learning difficulties is higher than in the general population⁵²⁻⁵⁵. Although the diversity of factors that may contribute to cognitive impairment – age of onset of seizures, etiology, genetics and drug treatment – clinical reports and laboratory evidence indicates that the recurrence of seizures has an important role in cognitive impairments⁴⁹.

Findings on cognitive development in patients who experienced recurrent febrile seizures are contradictory. Verity and colleagues⁵⁶ and Ellenberg and Nelson⁵⁷ found no difference in IQ between children with a single febrile

seizure and those with recurrent febrile seizures. However, Kolfen and colleagues report that children with multiple febrile seizures had worst neuropsychological performances than controls or patients with a single seizure caused by fever⁵⁸. Studies in models of repeated ELS indicate cognitive impairment during adolescence or adulthood. After flurothyl recurrent neonatal seizures, the animals showed impaired spatial memory^{49,59,60}. Similarly, repeated seizures caused by PTZ⁶¹ and hypertermia in rats¹³ during development resulted in impairment on tests of spatial memory.

The cellular and molecular mechanisms of long-standing cognitive impairment after ELS are still unclear. It is possible that sprouting of dentate mossy fibers following ELS is involved in the learning and memory deficits observed in the step-down inhibitory avoidance task²⁵. In a recent study, it has been reported a negative correlation between the latency to the step down in the test phase and the score for mossy fiber sprouting in Li-PILO-treated animals²⁵. However, some studies were unable to identify specific histological changes in the hippocampus that are critical predictors for the development of epilepsy after ELS⁶². Hence, changes at a cellular or molecular level, such as abnormalities in neuronal cytoarchitecture, neurotransmitter receptors subunits, voltage-gated channels or structural changes occurring outside the hippocampus may be critical mediators of epileptogenesis in the developing brain^{63,64}. In addition, some studies have indicated that the abnormal electrical activity associated with SE in neonatal rats can lead to life-long changes in the expression of glutamate receptors subunits and its transporters^{65,66}. The mechanisms responsible for the deficits associated with the seizures during development are still not clear, but synaptic plasticity dysfunctions in the hippocampus and extra-temporal networks are possible substrates of cognitive impairments.

SYNAPTIC PLASTICITY

The continuum between plasticity and pathology is a hypothesis supported by electrophysiological and molecular studies⁶⁷. Synaptic efficiency is regulated according to a dynamic balance between excitation and inhibition⁶⁷. It is suggested that in pathological conditions, the balance between excitation and inhibition would be disrupted, resulting in a tendency toward hyperexcitability and hypersynchrony^{67,68}. Consistently, long-term potentiation (a cellular model of memory; LTP) and kindling share similar mechanisms, such as the need for high-frequency stimulation, glutamatergic neurotransmission, regulation of intracellular calcium concentration, changes in gene expression, protein synthesis and synapse structure, and activity of metabotropic glutamate receptors⁶⁷.

Electrophysiological studies in models of epilepsy have shown that repeated seizures have deleterious effect on hippocampal LTP^{69,70}. Recently it was demonstrated a decrease in hippocampal LTP in rats submitted to SE⁶⁸. This effect was correlated with a worsening in spatial memory tasks dependent on the hippocampus. It has been argued that epileptiform discharges can generate saturation of the synaptic response or changes in the molecules associated with the induction of plasticity⁶⁸.

SYNAPTIC PLASTICITY IN EXPERIMENTAL ELS

Lynch et al demonstrated that a single seizure caused by kainic acid at different ages (P1, P7 and P14) was able to reduce the induction of LTP in hippocampus slices and increase paired pulse facilitation (a brief form of synaptic plasticity; PPF), which was related to deficits in spatial memory⁷¹. Similarly, Zhou et al., using hypoxia model of ELS, have found that 48-72h after seizures animals showed attenuation of LTP induced by stimulation of the Schaffer collaterals *in vitro*⁷². In the same animals, increased expression of AMPA receptors and a significant decrease in the incidence of silent synapses were found in the hippocampus⁷².

Synaptic plasticity dysfunctions were also reported in febrile seizures models¹. Animals submitted to frequent febrile ELS showed deficits in hippocampus dependent long-term memory, which was not observed in the animals that were submitted to a single febrile seizure or in control groups¹³. These findings argue that the cognitive deficits are consequences of recurrent febrile seizures. Similar hyperthermia seizures can lead to lasting bidirectional modulation of synaptic plasticity. Using hippocampal slices of developing rats subjected to frequent febrile seizures, Chang et al.¹³, observed impaired LTP and enhanced LTD (long term depression) in CA1 neurons. The molecular substrate involved is the transcription factor CREB (cAMP response element binding protein) that mediates nuclear response induced by activity and is involved in the mechanisms of synaptic plasticity¹. A decrease in CREB phosphorylation (pCREB) was found in the groups submitted to a learning task, although no changes were found in levels of synaptophysin, basal level of pCREB and total CREB level. Moreover, rolipram (phosphodiesterase antagonist) restored the phosphorylation of CREB after learning tasks, reversing these impairments¹³. Thus, ELS can generate behavioral abnormalities primarily related to subtle changes involving receptor expression, intracellular signaling and hippocampal synaptic efficiency in adults animals¹. However, most of these studies focused on hippocampal modifications and it is unclear how ELS affect more distributed circuits that could contribute both to seizure enhanced susceptibility and a poor cognitive outcome.

ELS AND EXTRA-TEMPORAL CIRCUITS

The investigation of abnormalities in extra-temporal circuits is important as it may help us to understand some behavioral disorders that are commonly associated with ELS including autism, attention-deficit-hyperactive-disorder, obsessive-compulsive disorder and psychosis⁷³. These conditions are thought to involve alterations in frontal lobe function, implying that ELS may permanently alter the neurological substrates underlying those behaviors. In this sense, it was recently demonstrated that flurothyl-induced ELS impairs behavioral flexibility as measured by the capacity to shift a lever-preference in an operant chamber with two levers – performance that requires a functional mPFC. Furthermore, the prelimbic mPFC seems to undergo an anatomical change with an increase in thickness particularly restricted to the deeper layers, with no change in cell density. PFC thickness was positively correlated with the acquisition of lever preference (i.e. increased preference implies less flexibility). Such correlation indicates that ELS induced alterations in the PFC, which could contribute to the behavioral flexibility impairments⁷⁴. ELS induced by Li-PILO also impact the neurotransmission in mPFC-associated networks⁷⁵. It was described that behavioural sensitization after repeated administration of methamphetamine in adolescent rats is enhanced if the animals are previously subjected to ELS at P10. In addition, it was demonstrated that Li-PILO ELS affects the prefrontal-striatal circuitry modulating the level of dopamine and glutamate. Particularly, the dopamine turnover was significantly higher in the mPFC of Li-PILO rats as compared controls. Besides, there was a significant increase of glutamate in the mPFC of Li-PILO rats⁷⁵. Altogether, these data indicate that the ELS model generated by Li-PILO treatment at P10 can reproduce some of the characteristic neurochemical changes observed in animal model of psychosis, such as the ketamine model⁷⁶.

In one study, the relationship between oscillatory patterns, memory and ELS was investigated in rats that experienced one hundred flurothyl-induced seizures during P15-P30⁷⁷. Animals had LFPs recorded from the prefrontal cortex and hippocampus (CA1 and CA3) during all phases of a delayed-nonmatch-to-sample (DNMS) task. The results indicate that following ELS, the initial performance deficit is followed by a recovery phase, which is associated with the development of distinct patterns of brain oscillations in the hippocampal-PFC network, when compared to control animals. Rats undergoing ELS showed increase in theta and gamma power, both during the acquisition and retrieval phase. ELS rats also demonstrated a parallel increase in PFC theta power together with the increase in difficulty of the DNMS test⁷⁷. An apparent limitation of this model is that, in addition to a normal development

towards adulthood following the ELS, adult animals have no epileptiform activity in their electroencephalogram recordings.

CONCLUSIONS

Taken together epidemiological studies show a close relationship between prolonged ELS and the emergence of subsequent epilepsy. However data on other neurological consequences, mainly the ones related to cognitive impairment and learning deficits are still controversial. Experimental studies have shown that seizures during development predispose and increase the response to a second seizure enhancing hippocampal excitability. Interestingly, this occurs without neuronal loss or cell damage involved in TLE. However more subtle changes in the glutamate and GABA receptors as well as h-channels and CB1 receptors expression are observed in ELS models and could underlie the enhanced susceptibility to new provoked seizures. Other evidences demonstrate a strong relationship between the frequency of seizures and impairments in learning and memory tasks. Apparently, recurrent seizures during development affect hippocampal plasticity decreasing LTP and increasing LTD, thus affecting performance on memory tasks. Repeated ELS affect the biochemical machinery involved in LTP, modifying the cAMP cascade response and CREB phosphorylation. This suggests that the ELS alter synaptic plasticity directly affecting proteins involved in the plasticity induction which may underlie the cognitive deficits seen in these models. However more studies are needed to determine the roles of this synaptic plasticity impairment in an epileptogenic set. Furthermore little is known about the mechanisms that lead to these molecular changes. We think that a further elucidation of these mechanisms may improve the clinical ELS outcome. Besides, most of the studies have focused on the hippocampus and little is known about the ELS effects on other brain regions. Experimental evidence has demonstrated that the mPFC is a structure affected in the ELS outcome. Also it is well know the importance of the mPFC to cognitive processes and their involvement with psychiatric disorder. Studies probing plasticity dysfunctions in extra temporal regions such as the prefrontal cortex are of great value to understand the clinical relevant comorbidities related to TLE and ELS.

REFERENCES

1. Huang CC, Chang YC. The long-term effects of febrile seizures on the hippocampal neuronal plasticity – clinical and experimental evidence. *Brain Dev* 2009;31(5):383-7.
2. Baram TZS, editors. *Febrile Seizures*. San Diego: Academic Press; 2002.
3. Hauser WA. The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia* 1994;35(Suppl 2):S1-6.

4. Raspall-Chaure M, Chin RF, Neville BG, Scott RC. Outcome of paediatric convulsive status epilepticus: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006;5(9):769-79.
5. Holmes GL. Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia* 1997;38(1):12-30.
6. Holmes GL. Effects of seizures on brain development: lessons from the laboratory. *Pediatr Neurol* 2005;33(1):1-11.
7. Holmes GL, Khazipov R, Ben-Ari Y. Seizure-induced damage in the developing human: relevance of experimental models. *Prog Brain Res* 2002;135:321-34.
8. Leite JR, Babb TL, Pretorius JK, Kuhlman PA, Yeoman KM, Mathern GW. Neuron loss, mossy fiber sprouting, and interictal spikes after intrahippocampal kainate in developing rats. *Epilepsy Res* 1996;26(1):219-31.
9. Dyhrfeld-Johnsen J, Morgan RJ, Foldy C, Soltesz I. Upregulated H-current in hyperexcitable CA1 dendrites after febrile seizures. *Front Cell Neurosci* 2008;2:2.
10. Santos NF, Marques RH, Correia L, Sinigaglia-Coimbra R, Calderazzo L, Sanabria ER, et al. Multiple pilocarpine-induced status epilepticus in developing rats: a long-term behavioral and electrophysiological study. *Epilepsia*. 2000;41(Suppl 6):S57-63.
11. Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ. Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci* 2002;22(11):4591-9.
12. Chen K, Aradi I, Thon N, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ, Soltesz I. Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nat Med* 2001;7(3):331-7.
13. Chang YC, Huang AM, Kuo YM, Wang ST, Chang YY, Huang CC. Febrile seizures impair memory and cAMP response-element binding protein activation. *Ann Neurol* 2003;54(6):706-18.
14. Chang YC, Kuo YM, Huang AM, Huang CC. Repetitive febrile seizures in rat pups cause long-lasting deficits in synaptic plasticity and NR2A tyrosine phosphorylation. *Neurobiol Dis* 2005;18(3):466-75.
15. Romcy-Pereira RN, Leite JR, Garcia-Cairasco N. Synaptic plasticity along the sleep-wake cycle: implications for epilepsy. *Epilepsy Behav* 2009;14(Suppl 1):47-53.
16. Jay TM, Rocher C, Hotte M, Naudon L, Gurden H, Spedding M. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses is impaired by loss of dopamine and stress: importance for psychiatric diseases. *Neurotox Res* 2004;6(3):233-44.
17. Lesch KP, Waider J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron* 2012;76(1):175-91.
18. Yin DM, Chen YJ, Sathyamurthy A, Xiong WC, Mei L. Synaptic dysfunction in schizophrenia. *Adv Exp Med Biol* 2012;970:493-516.
19. Schloesser RJ, Martinowich K, Manji HK. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. *Trends Neurosci* 2012;35(1):36-46.
20. Panayiotopoulos CP. The new ILAE report on terminology and concepts for the organization of epilepsies: critical review and contribution. *Epilepsia* 2012;53(3):399-404.
21. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010;51(4):676-85.
22. Chin RF, Neville BG, Peckham C, Bedford H, Wade A, Scott RC. Incidence, cause, and short-term outcome of convulsive status epilepticus in childhood: prospective population-based study. *Lancet* 2006;368(9531):222-9.
23. Rantanen K, Eriksson K, Nieminen P. Cognitive impairment in preschool children with epilepsy. *Epilepsia* 2011;52(8):1499-505.
24. Vendrame M, Alexopoulos AV, Boyer K, Gregas M, Haut J, Lineweaver T, et al. Longer duration of epilepsy and earlier age at epilepsy onset correlate with impaired cognitive development in infancy. *Epilepsy Behav* 2009;16(3):431-5.
25. de Oliveira DL, Fischer A, Jorge RS, da Silva MC, Leite M, Goncalves CA, et al. Effects of early-life LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus on memory and anxiety in adult rats are associated with mossy fiber sprouting and elevated CSF S100B protein. *Epilepsia* 2008;49(5):842-52.
26. Varodayan FP, Zhu XJ, Cui XN, Porter BE. Seizures increase cell proliferation in the dentate gyrus by shortening progenitor cell-cycle length. *Epilepsia* 2009;50(12):2638-47.
27. Xiu-Yu S, Ruo-Peng S, Ji-Wen W. Consequences of pilocarpine-induced recurrent seizures in neonatal rats. *Brain Dev* 2007;29(3):157-63.
28. Holmes GL. The long-term effects of neonatal seizures. *Clin Perinatol* 2009;36(4):901-14, vii-viii.
29. Haut SR, Veliskova J, Moshe SL. Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects. *Lancet Neurol* 2004;3(10):608-17.
30. Liu Z, Gatt A, Werner SJ, Mikati MA, Holmes GL. Long-term behavioral deficits following pilocarpine seizures in immature rats. *Epilepsy Res* 1994;19(3):191-204.
31. Stafstrom CE, Chronopoulos A, Thurber S, Thompson JL, Holmes GL. Age-dependent cognitive and behavioral deficits after kainic acid seizures. *Epilepsia* 1993;34(3):420-32.
32. Albala BJ, Moshe SL, Okada R. Kainic-acid-induced seizures: a developmental study. *Brain Res* 1984;315(1):139-48.
33. Huang L, Cilio MR, Silveira DC, McCabe BK, Sogawa Y, Stafstrom CE, et al. Long-term effects of neonatal seizures: a behavioral, electrophysiological, and histological study. *Brain Res Dev Brain Res* 1999;118(1-2):99-107.
34. Sperber EF, Haas KZ, Romero MT, Stanton PK. Flurothyl status epilepticus in developing rats: behavioral, electrographic histological and electrophysiological studies. *Brain Res Dev Brain Res* 1999;116(1):59-68.
35. Sperber EF, Haas KZ, Stanton PK, Moshe SL. Resistance of the immature hippocampus to seizure-induced synaptic reorganization. *Brain Res Dev Brain Res* 1991;60(1):88-93.
36. Sperber EF, Veliskova J, Germano IM, Friedman LK, Moshe SL. Age-dependent vulnerability to seizures. *Adv Neurol* 1999;79:161-9.
37. Walter C, Murphy BL, Pun RY, Spieles-Engemann AL, Danzer SC. Pilocarpine-induced seizures cause selective time-dependent changes to adult-generated hippocampal dentate granule cells. *J Neurosci* 2007;27(28):7541-52.
38. Kubova H, Mares P, Suchomelova L, Brozek G, Druga R, Pitkanen A. Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *Eur J Neurosci* 2004;19(12):3255-65.
39. Cavaleiro EA, Silva DF, Turski WA, Calderazzo-Filho LS, Bortolotto ZA, Turski L. The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. *Brain Res* 1987;465(1-2):43-58.
40. Dube C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, Brunson K, Soltesz I, Baram TZ. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. *Ann Neurol* 2000;47(3):336-44.
41. Dube CM, Brewster AL, Richichi C, Zha Q, Baram TZ. Fever, febrile seizures and epilepsy. *Trends Neurosci* 2007;30(10):490-6.
42. Toth Z, Yan XX, Haftoglou S, Ribak CE, Baram TZ. Seizure-induced neuronal injury: vulnerability to febrile seizures in an immature rat model. *J Neurosci* 1998;18(11):4285-94.
43. Dube C, Yu H, Nalcioğlu O, Baram TZ. Serial MRI after experimental febrile seizures: altered T2 signal without neuronal death. *Ann Neurol* 2004;56(5):709-14.
44. Dube C, Richichi C, Bender RA, Chung G, Litt B, Baram TZ. Temporal lobe epilepsy after experimental prolonged febrile seizures: prospective analysis. *Brain* 2006;129(Pt 4):911-22.
45. Chen K, Ratzliff A, Hilgenberg L, Gulyas A, Freund TF, Smith M, et al. Long-term plasticity of endocannabinoid signaling induced by developmental febrile seizures. *Neuron* 2003;39(4):599-611.
46. Ohno Y, Ishihara S, Mashimo T, Sofue N, Shimizu S, Imaoku T, et al. Scn1a missense mutation causes limbic hyperexcitability and vulnerability to experimental febrile seizures. *Neurobiol Dis* 2011;41(2):261-9.
47. Ouadouz M, Lema P, Awad PN, Di Cristo G, Carmant L. N-methyl-D-aspartate, hyperpolarization-activated cation current (Ih) and gamma-aminobutyric acid conductances govern the risk of epileptogenesis following febrile seizures in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 2010;31(7):1252-60.

48. Bourgeois BF, Prensky AL, Palkes HS, Talent BK, Busch SG. Intelligence in epilepsy: a prospective study in children. *Ann Neurol* 1983;14(4):438-44.
49. Holmes GL, Gairis JL, Chevassus-Au-Louis N, Ben-Ari Y. Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects. *Ann Neurol* 1998;44(6):845-57.
50. Chang YC, Guo NW, Huang CC, Wang ST, Tsai JJ. Neurocognitive attention and behavior outcome of school-age children with a history of febrile convulsions: a population study. *Epilepsia* 2000;41(4):412-20.
51. Chang YC, Guo NW, Wang ST, Huang CC, Tsai JJ. Working memory of school-aged children with a history of febrile convulsions: a population study. *Neurology* 2001;57(1):37-42.
52. Baillet LL, Turk WR. The impact of childhood epilepsy on neurocognitive and behavioral performance: a prospective longitudinal study. *Epilepsia* 2000;41(4):426-31.
53. Sillanpaa M, Jalava M, Kaleva O, Shinnar S. Long-term prognosis of seizures with onset in childhood. *N Engl J Med* 1998;338(24):1715-22.
54. Wakamoto H, Nagao H, Hayashi M, Morimoto T. Long-term medical, educational, and social prognoses of childhood-onset epilepsy: a population-based study in a rural district of Japan. *Brain Dev* 2000;22(4):246-55.
55. Williams J, Griebel ML, Dykman RA. Neuropsychological patterns in pediatric epilepsy. *Seizure* 1998;7(3):223-8.
56. Verity CM, Greenwood R, Golding J. Long-term intellectual and behavioral outcomes of children with febrile convulsions. *N Engl J Med* 1998;338(24):1723-8.
57. Ellenberg JH, Nelson KB. Febrile seizures and later intellectual performance. *Arch Neurol* 1978;35(1):17-21.
58. Kolfen W, Pehle K, König S. Is the long-term outcome of children following febrile convulsions favorable? *Dev Med Child Neurol* 1998;40(10):667-71.
59. Liu Z, Yang Y, Silveira DC, Sarkisian MR, Tandon P, Huang LT, et al. Consequences of recurrent seizures during early brain development. *Neuroscience* 1999;92(4):1443-54.
60. Neill JC, Liu Z, Sarkisian M, Tandon P, Yang Y, Stafstrom CE, et al. Recurrent seizures in immature rats: effect on auditory and visual discrimination. *Brain Res Dev Brain Res* 1996;95(2):283-92.
61. Huang LT, Yang SN, Liou CW, Hung PL, Lai MC, Wang CL, et al. Pentylentetrazol-induced recurrent seizures in rat pups: time course on spatial learning and long-term effects. *Epilepsia* 2002;43(6):567-73.
62. Hoffmann AF, Zhao Q, Holmes GL. Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the "two-hit hypothesis". *Epilepsy Behav* 2004;5(6):873-7.
63. Luo J, Xu Y, Zhu Q, Zhao F, Zhang Y, Peng X, et al. Expression pattern of Mical-1 in the temporal neocortex of patients with intractable temporal epilepsy and pilocarpine-induced rat model. *Synapse* 2011;65(11):1213-21.
64. Druga R, Mares P, Kubova H. Time course of neuronal damage in the hippocampus following lithium-pilocarpine status epilepticus in 12-day-old rats. *Brain Res* 2010;1355:174-9.
65. Milh M, Becq H, Villeneuve N, Ben-Ari Y, Aniksztejn L. Inhibition of glutamate transporters results in a "suppression-burst" pattern and partial seizures in the newborn rat. *Epilepsia* 2007;48(1):169-74.
66. Zhang G, Raol YS, Hsu FC, Brooks-Kayal AR. Long-term alterations in glutamate receptor and transporter expression following early-life seizures are associated with increased seizure susceptibility. *J Neurochem* 2004;88(1):91-101.
67. McEachern JC, Shaw CA. The plasticity-pathology continuum: defining a role for the LTP phenomenon. *J Neurosci Res* 1999;58(1):42-61.
68. Suarez LM, Cid E, Gal B, Inostroza M, Brotons-Mas JR, Gomez-Dominguez D, et al. Systemic injection of kainic Acid differently affects LTP magnitude depending on its epileptogenic efficiency. *PLoS One* 2012;7(10):e48128.
69. Ben-Ari Y, Represa A. Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci* 1990;13(8):312-8.
70. Leung LS, Wu C. Kindling suppresses primed-burst-induced long-term potentiation in hippocampal CA1. *Neuroreport* 2003;14(2):211-4.
71. Lynch M, Sayin U, Bownds J, Janumpalli S, Sutula T. Long-term consequences of early postnatal seizures on hippocampal learning and plasticity. *Eur J Neurosci* 2000;12(7):2252-64.
72. Zhou C, Lippman JJ, Sun H, Jensen FE. Hypoxia-induced neonatal seizures diminish silent synapses and long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 2011;31(50):18211-22.
73. Dunn DW. Neuropsychiatric aspects of epilepsy in children. *Epilepsy Behav* 2003;4(2):101-6.
74. Kleen JK, Sesque A, Wu EX, Miller FA, Hernan AE, Holmes GL, et al. Early-life seizures produce lasting alterations in the structure and function of the prefrontal cortex. *Epilepsy Behav* 2011;22(2):214-9.
75. Lin TC, Huang LT, Huang YN, Chen GS, Wang JY. Neonatal status epilepticus alters prefrontal-striatal circuitry and enhances methamphetamine-induced behavioral sensitization in adolescence. *Epilepsy Behav* 2009;14(2):316-23.
76. Gunduz-Bruce H. The acute effects of NMDA antagonism: from the rodent to the human brain. *Brain Res Rev* 2009;60(2):279-86.
77. Kleen JK, Wu EX, Holmes GL, Scott RC, Lenck-Santini PP. Enhanced oscillatory activity in the hippocampal-prefrontal network is related to short-term memory function after early-life seizures. *J Neurosci* 2011;31(43):15397-406.

Corresponding Author:

Rafael Naime Ruggiero
 Ribeirão Preto Medical School, Department of Neurosciences and Behavior
 University of São Paulo
 Av. Bandeirantes, 3900
 CEP 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil
 Phone: (+55-16) 3602-4535 – Fax: (+55-16) 3633-0866
 E-mail: rafaruggiero@gmail.com

Influências do Ambiente Sobre a Susceptibilidade às Crises Epilépticas: As Lições dos Modelos Experimentais

Eduardo Henrique de Lima Umeoka^{a,*,#}, Victor Rodrigues Santos^{b,#,*}, Norberto Garcia-Cairasco^{a,b,#}

Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo – USP, SP, Brazil

RESUMO

O propósito principal desta revisão é discutir a influência do ambiente sobre a susceptibilidade a crises e a epilepsia. Nós estamos constantemente expostos a diversas condições que exercem influências, positivas e negativas, sobre a nossa qualidade de vida. Esses fatores externos são capazes de moldar nossos cérebros desde a vida intrauterina até a morte. Eventos estressantes são reconhecidos como fator desencadeador de crises em pacientes com epilepsia. Diversos estudos experimentais estão de acordo com esses achados clínicos e apontam a corticosterona como o principal fator pró-convulsivo. Entretanto, os dados experimentais são vastos e apenas com atenção podemos detectar as informações relevantes. Por outro lado, ambientes enriquecidos promovem alterações plásticas em nossos cérebros, particularmente através da neurogênese, e podem potencialmente reduzir a susceptibilidade a crises, o dano neuronal e a neurogênese anormal induzidos pelas próprias crises. Finalmente, a prática regular de exercício físico tem se mostrado capaz de reduzir a frequência de crises e retardar o processo epileptogênico em modelos animais de epilepsia, além de reduzir ou mesmo eliminar os efeitos do estresse.

Unitermos: estresse; epilepsia; neurogênese; qualidade de vida; exercício físico.

ABSTRACT

Environment influence over epileptic seizure susceptibility: the lessons from experimental models

The main purpose of this review is to bring out to discussion the environment influence over seizure susceptibility and epilepsy. We are constantly exposed to such different conditions that exert positive as well as negative influences in our quality of life. These external factors are able to shape our brains and neural circuits from intrauterine life until death. Stressful events are known as seizure precipitants in patients with epilepsy. Although several animal studies are in line with these clinical findings, pointing out that corticosterone is one of the major pro-convulsant factor, however the experimental data are vast and only with close attention we can detect the relevant information. On the other hand, enriched environments promote plastic changes in our brains, particularly through neurogenesis, that can potentially reduce seizure susceptibility, and the aberrant neurogenesis and neuronal damage both induced by the seizures themselves. Finally, regular practice of physical exercise has been shown to reduce seizure frequency and delay epileptogenic process in animal models of epilepsy, in addition to reduce, or even eliminate stress levels.

Keywords: stress; epilepsy; neurogenesis; quality of life; physical exercise.

^a Neuroscience and Behavioral Science Department – Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo – USP, Brazil.

^b Physiology Department – Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo – USP, Brazil.

[#]Neurophysiology and Experimental Neuroethology Laboratory, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo – USP, Brazil.

*Igual contribuição.

Received December 05, 2012; accepted December 12, 2012.

OBJETIVOS

O objetivo desta revisão é trazer da literatura achados sobre a influência dos fatores do ambiente (externos), especialmente estresse, enriquecimento ambiental e atividade física sobre a susceptibilidade às crises epiléticas, observados na clínica e obtidos através de modelos experimentais de epilepsia, bem como discutir de que modo poderíamos fazer a interpretação destes dados. Entretanto, devemos explorar neste artigo a influência de apenas alguns desses fatores sobre a susceptibilidade às crises epiléticas, tanto em pacientes como em modelos animais para o estudo das epilepsias.

INTRODUÇÃO

Estamos constantemente expostos a diferentes condições do ambiente, que exercem influência tanto positiva quanto negativa em diversos aspectos das nossas vidas. As condições do ambiente que iremos discutir pouco têm a ver com clima ou geografia, e sim com fatores capazes de moldar circuitos neuronais, desde a vida pré-natal até a morte do indivíduo. Tais fatores podem ser acidentais, como adversidades na vida precoce, ou intencionais como intervenções específicas para promover bem-estar, por exemplo a prática regular de exercício físico¹.

Não é incomum nos dias de hoje ouvir pessoas se queixando de estresse, “um estado mental que envolve tanto o cérebro quanto o corpo, assim como suas interações; o estresse difere entre os indivíduos e interfere não apenas nos grandes eventos da vida, mas também nos conflitos e pressões do dia-a-dia”². Contudo, o que poucas pessoas sabem é que elas podem, intencionalmente, evitar ou diminuir a influência do ambiente nas suas vidas, mudando ou adotando novas práticas diárias. O entorno social bem como o ambiente físico ao qual os indivíduos são expostos têm efeitos poderosos sobre o corpo e sobre o cérebro através dos sistemas endócrino e autonômico e são capazes de promover alterações plásticas e funcionais em estruturas como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal^{1,2}.

ESTRESSE

O corpo humano procura manter-se em um estado de equilíbrio, tal estado é definido como homeostase^{3,4}. A ameaça à homeostase promove uma resposta adaptativa do organismo a fim de restabelecer o equilíbrio⁵, esta resposta é chamada de resposta do estresse^{6,7}.

A resposta do estresse pode ser dividida em duas etapas, que embora ocorram simultaneamente, apresentam cinéticas distintas. A primeira e mais rápida é a ativação do sistema simpático-adrenomedular, que promove um grande aumento nos níveis séricos de adrenalina e noradrenalina

e também um aumento da noradrenalina no cérebro. A segunda, mais lenta e duradoura, é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA)^{5,8,9}.

A ativação do eixo HHA caracteriza-se pela liberação hipotalâmica do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina (AVP), que atuam estimulando a hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez atua sobre o córtex da glândula adrenal, promovendo a liberação principalmente de cortisol em humanos e em roedores de corticosterona^{10,11}. As ações centrais do cortisol/corticosterona são mediadas por receptores de Glicocorticóides (GR) e Mineralocorticóides (MR), que apresentam afinidade e distribuição distintas no cérebro. O GR é expresso abundantemente em quase todo o cérebro, enquanto o MR, embora apresente afinidade cerca de dez vezes maior que o GR, é encontrado em regiões restritas do cérebro, especialmente em estruturas do sistema límbico, como hipocampo e amígdala^{12,13}.

Além das catecolaminas, dos hormônios do eixo HHA e dos glicocorticóides, a resposta do estresse envolve a participação de diversos mediadores como neurosteróides, urocortina, serotonina, dopamina, orexina e dinorfina, entre outros¹¹.

EPILEPSIA

Epilepsia é uma doença caracterizada pela ocorrência de crises recorrentes espontâneas que podem ser convulsivas ou não^{14,15,16}, e acomete cerca de 1% da população mundial^{15,17}. De um modo geral, entre todas as epilepsias, a Epilepsia de Lobo Temporal (ELT) é a mais comum entre adultos e se instala geralmente após um insulto inicial (trauma, crise febril ou *Status Epilepticus* – SE) ou em decorrência de outras patologias como tumor, encefalites, esclerose tuberosa, entre outras¹⁵. O intervalo variado entre o insulto inicial e a primeira crise espontânea é reconhecido como período latente¹⁸. Processos que causem alterações estruturais (macroscópicas ou microscópicas) ou funcionais que alterem a atividade normal dos neurônios cerebrais podem predispor às crises epiléticas, especialmente durante o período latente, ou epileptogênese.

A abordagem terapêutica mais utilizada para o controle de crises em pacientes epiléticos é o tratamento farmacológico. Entretanto, uma fração considerável dos pacientes com ELT não responde aos medicamentos convencionais^{19,20,21} e a maioria dos medicamentos, se não todos, apresenta efeitos colaterais significativos²². Nesses casos, de pacientes fármaco-resistentes, as ressecções cirúrgicas de focos epiléticos situados em estruturas como, por exemplo, o hipocampo, são bastante eficazes no controle das crises^{20,23} entretanto, esta abordagem está associada, em alguns casos, a importantes déficits cognitivos e de memória²⁴.

Terapias não farmacológicas complementares podem ser utilizadas por pacientes com epilepsia como terapias auxiliares, na tentativa de diminuir a susceptibilidade e frequência de crises e também os efeitos deletérios crônicos causados pelas crises. Neste contexto, podemos destacar a prática de exercícios físicos e o enriquecimento ambiental (EA), como abordagens diárias promissoras utilizadas por pacientes ou em modelos animais que exercem ações diretas na plasticidade cerebral e nas epilepsias^{25,26}.

O período entre a ocorrência do insulto precipitante inicial e a instalação da fase crônica da epilepsia (com crises recorrentes espontâneas), corresponde a uma importante janela para intervenção terapêutica utilizando abordagens que tenham potencial para prevenir ou retardar a fase crônica, ou os danos a longo prazo no aprendizado e na memória.

ESTRESSE E EPILEPSIA

Evidências clínicas indicam o estresse como o fator desencadeador de crises mais relatado por pacientes com epilepsia²⁷⁻³¹, sendo o estresse emocional o mais frequente³². Em um trabalho recente foi observado que, em 51% das crianças com epilepsia estudadas, o estresse pôde provocar crises³³. Estudos destacam desastres naturais como terremoto³⁴ e ameaça de inundação³⁵ (evidentes ameaças ao equilíbrio do organismo), como fatores que promovem a resposta do estresse numa grande quantidade de indivíduos e consequentemente um aumento na frequência de crises, epiléticas ou não. Há também indícios sobre o efeito do estresse sobre susceptibilidade às crises provenientes de estudos realizados em zonas de guerra. Soldados em campo de batalha apresentam maior frequência de crises quando comparados com soldados submetidos a condições menos estressantes³⁶, e crianças com epilepsia que vivem em zona de conflito têm maior frequência de crises quando comparadas às crianças que vivem em regiões pacíficas³⁷.

Embora as evidências clínicas da literatura mostrem um relativo consenso sobre a influência do estresse sobre a susceptibilidade às crises, não se sabe muito sobre os mecanismos através dos quais o estresse exerce seu efeito pró-convulsivo, e nesse sentido os estudos em modelos animais de epilepsia ajudam a elucidar tais mecanismos. O trabalho em laboratório possibilita um grande controle sobre as variáveis do estudo, sobretudo daquelas que não podemos controlar na clínica. Entretanto, quando olhamos para os estudos experimentais sobre a relação estresse-epilepsia encontramos uma gama heterogênea de animais, modelos de indução de crises, ferramentas tecnológicas, mediadores da resposta do estresse, substratos anatômicos, fase do desenvolvimento e, como não poderia ser diferente, uma variedade de achados^{7,8}.

Grande parte dos estudos com modelos animais de epilepsia, utilizam os modelos de ELT, muito possivelmente devido à relevância clínica, visto que é o tipo mais comum de epilepsia em adultos^{15,17}. Um modelo muito utilizado para indução de ELT em ratos é o abrasamento (*kindling*) elétrico³⁸ do hipocampo ou da amígdala. Estudos utilizando abrasamento do hipocampo mostram que ratos machos adultos que recebem um implante subcutâneo liberador de corticosterona atingem o estado máximo do *kindling*, mensurado através da escala de Racine³⁹, mais brevemente, e apresentam maior amplitude média de disparos quando comparado com animais que receberam implantes placebo⁴⁰. Ratas, tratadas com corticosterona, submetidas ao *kindling* do hipocampo ou *kindling* da amígdala mostraram uma diminuição no limiar para pós descargas em comparação com fêmeas do grupo controle⁴¹; e ratas, ovariectomizadas, tratadas com corticosterona na água da dieta precisaram de menor quantidade de estímulos para alcançar o estado máximo do *kindling* (Racine classe V) e tiveram uma maior duração das pós descargas em comparação com as ratas do grupo controle⁴². O efeito da corticosterona no modelo de *kindling* elétrico é mediado pelos dois tipos de receptores de corticosterona⁴³.

Assim como nos modelos de *kindling*, os modelos de indução de ELT através de agentes químicos são importantes para o estudo dos efeitos dos mediadores da resposta do estresse sobre a susceptibilidade às crises. Trabalhos utilizando pilocarpina (PILO), um agonista muscarínico que provoca SE e subsequentemente crises espontâneas¹⁸, mostram que camundongos tratados com corticosterona (s.c.) após o SE apresentam maior frequência e duração de eventos epileptiformes em registros EEGráficos espontâneos recorrentes do que os animais tratados com veículo⁴⁴, e que o protocolo de estresse por separação materna é responsável pela diminuição no limiar para crises em ratos⁴⁵. O ácido cálnico (AC) agonista dos receptores para glutamato, assim como a PILO, é amplamente utilizado para indução de ELT em roedores. Trabalhos mostram que a corticosterona é um agente pró-convulsivo tanto em ratos⁴⁶ como em camundongos⁴⁷ adultos submetidos a SE induzido por AC.

Evidenciamos com esses achados o papel da corticosterona em modelos de ELT, pois a corticosterona tem participação crucial na resposta do estresse, uma vez que é o efector final do eixo HHA, além disso a expressão dos dois receptores de corticosterona confere ao hipocampo um papel central na mediação da resposta do estresse e na geração de crises. Embora a corticosterona tenha evidente importância, os demais mediadores da resposta do estresse, já mencionados, também devem ser considerados relevantes na relação estresse-epilepsia.

Outros modelos experimentais de epilepsia, além dos modelos de ELT, também sofrem influência dos

mediadores da resposta do estresse, os trabalhos ainda não são abundantes na literatura, mas apontam para uma relação do estresse com modelos genéticos de epilepsia de ausência⁴⁸ e audiogênica⁴⁹.

Os achados experimentais de indução de crises, associados com estresse de nado forçado, tanto em camundongos^{50,51} como em ratos⁵² adultos, mostram que a resposta do estresse age não somente de maneira pró-convulsiva, mas também de maneira anticonvulsiva. Os efeitos anticonvulsivos da resposta do estresse são atribuídos às catecolaminas atuando em receptores Beta-1 e Alpha-2^{50,51} e à tetrahydrodeoxicorticosterona (THDOC), um neurosteróide metabólito da deoxycorticosterona (DOC)⁵².

Portanto, a influência da resposta do estresse sobre a susceptibilidades às crises epiléticas não deve ser considerada um evento singular, e sim multifatorial, com fatores atuando sinergicamente e/ou antagonicamente, a depender de múltiplos fatores, como tipo, intensidade e duração do evento estressor, idade do indivíduo quando submetido ao estresse e quando avaliado, contexto, sítio de atuação dos mediadores. Além, é claro, do tipo de epilepsia associada com cada uma dessas variáveis.

ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E EXERCÍCIO FÍSICO

Estudos recentes mostram que algumas dessas terapias não farmacológicas complementares, tais como prática regular de exercícios físicos, técnicas de redução ou controle do estresse e EA são promissoras na melhora nos sintomas de déficits neurológicos em modelos animais das doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington⁵³.

No EA, a exposição de animais à um ambiente que aumente a interação social e os estímulos sensoriais, cognitivos e motores produz expressivas alterações na fisiologia e no comportamento do animal⁵³. As principais alterações na estrutura cerebral são aumento do peso e espessura do córtex⁵⁴, do comprimento e do número de ramificações dendríticas, do número de espinhos dendríticos⁵⁵, e no tamanho das sinapses de algumas populações neuronais⁵⁶.

A neurogênese (geração de novos neurônios no cérebro adulto) ocorre durante toda a vida no hipocampo e é mediada por células tronco residentes na camada subgranular do giro denteado (SGZ)⁵⁷. Além de alterações nas células já existentes nos circuitos cerebrais, o EA promove expressivo aumento do número de novos neurônios hipocampais através do aumento da proliferação de células progenitoras, da diferenciação de novos neurônios e incorporação destes à circuitaria hipocampal^{58,59}. O aumento da neurogênese pode estar associado à amplificação na expressão de diversos fatores de crescimento⁶⁰, tais como: o fator de

crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor* – VEGF)⁶¹, fator de crescimento derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* – BDNF) e fator de crescimento neural (*nerve growth factor* – NGF)^{62,63}. Muito embora durante a fase aguda, como após o SE, ocorra um aumento expressivo na proliferação do número de novas células no hipocampo⁶⁴, as alterações no número de novos neurônios vem acompanhadas de diversas alterações aberrantes na morfologia e de migração para locais ectópicos,^{65,66} bem como, na redução drástica do número de espinhos dendríticos em células novas do hipocampo de diferentes idades^{67,68}. Após alguns meses, na fase crônica, há um déficit na geração de novos neurônios⁶⁹, podendo essa redução, na geração dessas células, estar relacionada a déficits cognitivos e de memória vistos em alguns pacientes.

O EA, utilizado como ferramenta para reverter os efeitos deletérios na cognição e memória causados pela epilepsia, pode ter ação na melhora da função cognitiva através do aumento na neurogênese hipocampal. Diversos trabalhos da literatura mostram que animais expostos a ambientes enriquecidos, seguidos do aumento da neurogênese, apresentam melhor performance em testes de memória espacial e aprendizado em labirintos aquáticos⁵⁸ e tarefas de aprendizado dependentes do hipocampo⁵⁶. Uma das possíveis causas desta melhora pode ser atribuída ao EA que exerce influência em várias etapas da neurogênese, aumentando desde a proliferação celular até a taxa de incorporação dos novos neurônios ao circuito existente⁶⁰ associados com a melhora das funções cognitivas e de memória^{25,53}. O aumento na neurogênese está associado também aos efeitos antidepressivos dos fármacos bloqueadores seletivos da recaptção de serotonina⁷⁰.

Trabalhos vêm demonstrando a perda significativa de neurônios em diversas áreas cerebrais, principalmente no hipocampo, de animais e de pacientes com ELT, e traçando uma relação direta entre número de crises e quantidade de neurônios em degeneração^{71,72,73}. O EA tem mostrado efeitos neuroproteores em modelos químicos e elétricos de ELT. Animais mantidos em ambientes enriquecidos apresentam menor susceptibilidade às crises induzidas por AC, com significativa redução da morte de neurônios hipocampais, mesmo quando tratados com uma dose supralimiar de AC⁷⁴ e apresentam aumento no limiar para indução de crises induzidas por *kindling* elétrico da amígdala⁷⁵ quando comparados aos animais que foram mantidos em caixas padrão.

Apesar dos dados positivos desses trabalhos, ambos utilizaram o EA antes do insulto inicial (SE ou *kindling*), como uma forma preventiva da epileptogênese. Entretanto, para fins terapêuticos é interessante a avaliação do efeito da exposição ao EA em situações pós insulto inicial. Alguns trabalhos têm sido realizados com essa abordagem, contudo

os dados ainda não são conclusivos e mais experimentos são necessários para um melhor entendimento dos efeitos do EA sobre o processo epileptogênico e, por fim, vislumbrar uma possível intervenção terapêutica auxiliar aos fármacos.

Outra abordagem complementar alternativa utilizada por pessoas com epilepsia é a prática regular de exercícios físicos. Estudos em animais de laboratório têm demonstrado o papel do exercício físico no controle de crises. Arida e colaboradores, 1998 demonstraram que a prática regular de exercícios pode retardar o desenvolvimento do *kindling* da amígdala em ratos. Em animais epiléticos, durante o período de exercício físico regular, foi observada a redução de crises espontâneas na fase crônica da doença⁷⁶. O exercício físico também é uma eficiente terapia utilizada na redução do estresse⁷⁷, já discutido antes como o fator precipitante de crises mais frequentemente relatado por pessoas com epilepsia.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados e discutidos nesta revisão evidenciam a influência do ambiente e do estilo de vida adotado por cada indivíduo sobre a plasticidade cerebral, susceptibilidade a crises epiléticas, e, consequentemente, sobre a qualidade de vida de pessoas que vivem com epilepsia. Fatores ambientais que desencadeiam a resposta do estresse são potenciais gatilhos para crises, entretanto intervenções voluntárias em atividades diárias são capazes de proporcionar efeitos positivos na vida desses pacientes, seja através de ambientes favoráveis (enriquecidos), seja por meio da prática regular de exercícios físicos. Tais abordagens, dependendo da janela de intervenção, podem ser consideradas como terapias complementares e podem aumentar significativamente a qualidade de vida das pessoas com epilepsia, pela redução do número de crises, mas também pela melhora da performance cognitiva.

AGRADECIMENTOS

FAPESP, FAPESP-CINAPCE, CAPES, CNPq, FAEP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo e a todos os membros do Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental, que contribuíram de alguma forma na elaboração deste manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Davidson RJ, McEwen BS. Social influences on neuroplasticity: stress and interventions to promote well-being. *Nature neuroscience* 2012;15:689-95.
- McEwen BS. Correction for McEwen, Brain on stress: How the social environment gets under the skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:1561.
- McEwen BS. Mood disorders and allostatic load. *Biological Psychiatry* 2003;54:200-7.
- Chrousos PG. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology* 2009;5:374-81.
- De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2005;6:463-75.
- McEwen BS. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiological reviews* 2007;87:873-904.
- Joëls M. Stress, the hippocampus, and epilepsy. *Epilepsia* 2009;50:586-97.
- Sawyer NT, Escayg A. Stress and Epilepsy: Multiple Models, Multiple Outcomes. *Journal of Clinical Neurophysiology* 2010;27:445-52.
- Valentino RJ, Van Bockstaele E. Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *European Journal of Pharmacology* 2008;583:194-203.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2003;24:151-80.
- Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience* 2009;10:459-66.
- De Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cellular and molecular neurobiology* 1993;13:433-55.
- Kloet ERDE, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Pharmacology M, Amsterdam L. Health and Disease. *Endocrine reviews* 1998;19:269-301.
- Engel Jr J. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy* 1996;26:41-50.
- McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 1999;399:A15-22.
- Engel Jr J. Concepts of Epilepsy. *Epilepsia* 1995;36(Suppl 1):S23-9.
- Pitkänen A. et al. Epileptogenesis in Experimental Models. *Epilepsia* 2007;48:13-20.
- Leite JP, Bortolotto Z, Cavalheiro E. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 1990;14:511-7.
- Regesta G, Tanganelli P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy research* 1999;34:109-22.
- Engel J. Mesial Temporal Lobe Epilepsy: What Have We Learned? *The Neuroscientist* 2001;7:340-52.
- McKeown MJ, McNamara JO. When Do Epileptic Seizures Really Begin? *Neuron* 2001;30:1-9.
- Mula M. Recent and future antiepileptic drugs and their impact on cognition: what can we expect? *Expert Review of Neurotherapeutics* 2012;2:667-71.
- Terra-Bustamante VC, Inuzuca LM, Fernandes RM, Funayama S, Escorsi-Rosset S, Wichert-Ana L, Santos AC, Araujo D, Machado HR, Sakamoto AC. Temporal lobe epilepsy surgery in children and adolescents: clinical characteristics and post-surgical outcome. *Seizure* 2005;14:274-81.
- Richardson MP, Strange BA, Thompson PJ, Baxendale SA, Duncan JS, Dolan RJ. Pre-operative verbal memory fMRI predicts post-operative memory decline after left temporal lobe resection. *Brain* 2004;127:2419-26.
- Dhanushkodi A, Shetty AK. Is exposure to enriched environment beneficial for functional post-lesional recovery in temporal lobe epilepsy? *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2008;32:657-74.
- Schachter SC. Complementary and alternative medical therapies. *Current opinion in neurology* 2008;21:184-9.
- Frucht MM, Quigg M, Schwaner C, Fountain NB. Distribution of seizure precipitants among epilepsy syndromes. *Epilepsia* 2000;41:1534-9.
- Spector S, Cull C, Goldstein LH. Seizure precipitants and perceived self-control of seizures in adults with poorly-controlled epilepsy. *Epilepsy research* 2000;38:207-16.
- Da Silva Sousa P, Lin K, Garzon E, Sakamoto AC, Yacubian EM. T. Self-perception of factors that precipitate or inhibit seizures in juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure* 2005;14:340-6.

30. Sperling MR, Schilling C, Glosser D, Tracy JI, Asadi-Pooya A. Self-perception of seizure precipitants and their relation to anxiety level, depression, and health locus of control in epilepsy. *Seizure* 2008;17:302-7.
31. Lunardi MDS, Sukys-Claudino L, Guarnieri R, Walz R, Lin K. Seizure precipitants and inhibiting factors in mesial temporal lobe epilepsy. *Journal of the neurological sciences* 2011;308:21-4.
32. Nakken KO et al. Which seizure-precipitating factors do patients with epilepsy most frequently report? *Epilepsy & behavior* 2005;6: 85-9.
33. Campen S, Van Jansen FE, Steinbusch LC, Braun KPJ. Stress sensitivity of childhood epilepsy is related to experienced negative life events. *Epilepsia* 2012;53(9):1554-62.
34. Shibahara I, Osawa SI, Kon H, Morita T, Nakasato N, Tominaga T, Narita N. Increase in the number of patients with seizures following the Great East-Japan Earthquake. *Epilepsia* 2013;1-4.
35. Swinkels WA, Engelsman M, Kasteleijn-Nolst Trenité DG, Baal MG, de Haan GJ, Oosting J. Influence of an evacuation in February 1995 in The Netherlands on the seizure frequency in patients with epilepsy: a controlled study. *Epilepsia* 1998;39:1203-7.
36. Moshe S, Shilo M, Chodick G, Yagev Y, Blatt I, Korczyn AD, Neufeld MY. Occurrence of seizures in association with work-related stress in young male army recruits. *Epilepsia* 2008;49:1451-6.
37. Bosnjak J, Vukovic-Bobic M, Mejaski-Bosnjak V. Effect of war on the occurrence of epileptic seizures in children. *Epilepsy & Behavior* 2002;3:502-9.
38. McIntyre DANC, Leech CK. From Daily in Brain Electrical Function Stimulation Resulting. *Experimental neurology* 1969;330:295-330.
39. Racine RJ, Method G. Modification of Seizure Activity by Electrical Modification of After-Discharge. *Electroencephalography Clinical Neurophysiology* 1972;32(3):269-79.
40. Karst H, De Kloet ER, Joëls M. Episodic corticosterone treatment accelerates kindling epileptogenesis and triggers long-term changes in hippocampal CA1 cells, in the fully kindled state. *The European journal of neuroscience* 1999;11:889-98.
41. Edwards HE, Burnham WM, Mendonca, Bowlby D, MacLusky NJ. Steroid hormones affect limbic afterdischarge thresholds and kindling rates in adult female rats. *Brain research* 1999;838:136-50.
42. Taher TR, Salzberg M, Morris MJ, Rees S, O'Brien TJ. Chronic low-dose corticosterone supplementation enhances acquired epileptogenesis in the rat amygdala kindling model of TLE. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:1610-6.
43. Kumar G, Couper A, O'Brien TJ, Salzberg MR, Jones NC, Rees SM, Morris MJ. The acceleration of amygdala kindling epileptogenesis by chronic low-dose corticosterone involves both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:834-42.
44. Castro OW, Santos VR, Pun RY, McKlveen JM, Batie M, Holland KD, Gardner M, Garcia-Cairasco N, Herman JP, Danzer SC. Impact of Corticosterone Treatment on Spontaneous Seizure Frequency and Epileptiform Activity in Mice with Chronic Epilepsy. *PLoS One* 2012;7:1-9.
45. Lai M-C et al. Effect of neonatal isolation on outcome following neonatal seizures in rats-the role of corticosterone. *Epilepsy research* 2006;68:123-36.
46. Smith-Swintosky VL, Pettigrew LC, Sapolsky RM, Phares C, Craddock SD, Brooke SM, Mattson MP, Metyrapone, an inhibitor of glucocorticoid production, reduces brain injury induced by focal and global ischemia and seizures. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 1996;16:585-98.
47. Roberts J, Keith LD. Mineralocorticoid receptors mediate the enhancing effects of corticosterone on convulsion susceptibility in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1994;270:505-11.
48. Schridde U, Van Luijtelaar G. Corticosterone increases spike-wave discharges in a dose- and time-dependent manner in WAG/Rij rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 2004;78:369-75.
49. Umeoka EHL, Britto S, Antunes-Rodrigues J, Elias LLK, Garcia-Cairasco N. Functional characterization of the hypothalamic – pituitary – adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. *Brain Research* 2011;1381:141-7.
50. Pericic D, Jazvinscak M, Svob D, Mirkovic K. Beta-1 adrenoceptor antagonists potentiate the anticonvulsive effect of swim stress in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 2000;67:507-10.
51. Perićić D, Svob D, Jazvinscak Jembrek M, Mirković K. The involvement of alpha2-adrenoceptors in the anticonvulsive effect of swim stress in mice. *Psychopharmacology* 2001;158:87-93.
52. Reddy DS, Rogawski MA. Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility. *Journal of Neuroscience* 2002;22(9):3795-805.
53. Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 2006;7:697-709.
54. Bennett EL, Rosenzweig MR, Diamond MC. Rat Brain: Effects of Environmental Enrichment on Wet and Dry Weights Monosodium L-Glutamate: Its Pharmacology and Role in the Chinese Restaurant Syndrome. *Science* 1969;163(3869):825-6.
55. Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behavioural Brain Research* 2005;163(1):78-90.
56. Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyn M, Tsien JZ. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature neuroscience* 2000;3:238-44.
57. Gage FH. Mammalian Neural Stem Cells. *Science* 2000;287:1433-8.
58. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386(6624):493-5.
59. Praag H, Van Kempermann G, Gage FH. Neural Consequences of Environmental Enrichment. *Nature Reviews Neuroscience* 2000;1:1-8.
60. Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR. Environmental Enrichment and Voluntary Exercise Massively Increase Neurogenesis in the Adult Hippocampus via Dissociable Pathways. *Hippocampus* 2006;260, 250-60.
61. During MJ, Cao L. VEGF, a Mediator of the Effect of Experience on Hippocampal Neuro-genesis. *Current Alzheimer Research* 2006;29-33.
62. Pham TM, So S. Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. *Behavioural Brain Research* 1999;103:63-70.
63. Torasdotter M, Metsis M, Henriksson BG, Winblad B, Mohammed H. Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behavioural brain research* 1998;93:83-90.
64. Parent JM et al. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 1997;17:3727-38.
65. Walter C, Murphy BL, Pun RYK, Spieles-engemann AL, Danzer SC. Pilocarpine-Induced Seizures Cause Selective Time-Dependent Changes to Adult-Generated Hippocampal Dentate Granule Cells. *Journal of Neuroscience* 2007;27:7541-52.
66. Jessberger S, Zhao C, Toni N, Clemenson Jr GD, Li Y, Gage FH. Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. *Journal of Neuroscience* 2007;27(35):9400-7.
67. Murphy BL, Pun RY, Yin H, Faulkner CR, Loepke AW, Danzer SC. Heterogeneous Integration of Adult-Generated Granule Cells into the Epileptic Brain. *Journal of Neuroscience* 2011;31:105-17.
68. Santos VR, de Castro OW, Pun RY, Hester MS, Murphy BL, Loepke AW, Garcia-Cairasco N, Danzer SC. Contributions of mature granule cells to structural plasticity in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2011;197:348-57.
69. Hattiangady B, Rao MS, Shetty AK. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus. *Neurobiology of Disease* 2004;17:473-90.
70. Sahay A, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature Neuroscience* 2007;10:1110-5.
71. Fujikawa DG. Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection. *Epilepsy & behavior* 2005;7(Suppl 3):S3-11.

72. Furtado M, Castro OW, Del Vecchio F, De Oliveira JC, Garcia-Cairasco N. Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Epilepsy & Behavior* 2011;20:257-66.
73. Castro OW, Furtado MA, Tilelli CQ, Fernandes A, Pajolla GP. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Research* 2010;1374:43-55.
74. Young D, Lawlor P, Leone P, Dragunow M, During MJ. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature medicine* 1999;5:448-53.
75. Auvergne R et al. Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment. *Brain research* 2002;954:277-85.
76. Arida RM, Scorza F, Dos Santos NF, Peres C, Cavalheiro E. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy research* 1999;37:45-52.
77. Arida RM et al. Physical exercise in epilepsy: what kind of stressor is it? *Epilepsy & behavior* 2009;16:381-7.

Endereço para correspondência:

Eduardo Henrique de Lima Umeoka
 Norberto Garcia-Cairasco
 Neurophysiology and Experimental Neuroethology Laboratory (LNNE)
 Physiology Department – Ribeirão Preto School of Medicine
 University of São Paulo (USP)
 Av. Bandeirantes, 3900
 CEP 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil
 Phone: (55-16) 3602-3330
 E-mail: eduardoumeoka@gmail.com
 ngcairas@fmrp.usp.br

Imagem por Fontes Eletroencefalográficas – Uma Revisão Sistemática Sobre Sua Acurácia na Determinação da Zona Epileptogênica em Pacientes com Epilepsia Focal Refratária

Danilo Maziero^a, Marcio Sturzbecher^a, Carlos E. G. Salmon^a, Tonicarlo R. Velasco^b

Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil

RESUMO

O objetivo da avaliação pré-cirúrgica em pacientes com epilepsia refratária é delimitar a zona epileptogênica (ZE), área do encéfalo capaz de gerar crises e cuja ressecção tem o potencial para abolir ou reduzir as crises do paciente. Neste sentido, há um grande esforço no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas diagnósticas não invasivas que possam localizar a ZE com precisão, buscando evitar ou diminuir a utilização de métodos invasivos, de custo e risco elevados. Uma técnica diagnóstica que tem recebido renovada atenção é a Imagem de Fontes Eletroencefalográficas (IFE). O uso dessa técnica se baseia no fato de que a localização da área do encéfalo geradora das descargas interictais (zona irritativa) guarda próxima relação com a ZE. Estudos recentes têm sugerido que a IFE tem um potencial para determinar a localização da ZE similar à magnetoencefalografia. Nesta revisão, analisamos estudos recentes utilizando a técnica na localização da ZE de pacientes com epilepsia refratária. Encontramos evidências de que a acurácia média do teste foi de 79%, bastante similar à acurácia da Imagem por Fontes Magnéticas reportada na literatura, que é de aproximadamente 77%.

Unitermos: epilepsia refratária; EEG; imagem por fontes eletroencefalográficas.

ABSTRACT

EEG source imaging – a systematic review about its accuracy in defining the epileptogenic zone in patients with refractory focal epilepsy

The main goal of presurgical evaluation in patients with refractory epilepsy is to define the localization and extension of epileptogenic zone (EZ), the brain area responsible for generating seizures and whose resection has the potential to reduce or abolish epileptic seizures. Therefore, there has been an effort to develop diagnostic tests that can accurately localize the EZ non-invasively, avoiding invasive investigations that are risky and expensive. A diagnostic technique that has received renewed interest is electroencephalographic source imaging (ESI). This technique is based on the assumption that the irritative zone, the brain area that generates interictal EEG spikes, is spatially related with the EZ. Recent studies have shown that EEG has the potential to determine the localization of EZ similar to magnetoencephalography. In this review, we searched for studies reporting the accuracy of ESI on presurgical evaluation of patients with refractory epilepsy. We found that the accuracy of the test was 79% overall, similar to the accuracy of magnetic source imaging reported in the literature (77%).

Keywords: refractory epilepsy; EEG; EEG source imaging.

^a Departamento de Física, FFLCRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

^b Centro de Cirurgia de Epilepsia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

Received December 18, 2012; accepted January 12, 2013.

INTRODUÇÃO

O objetivo da avaliação pré-cirúrgica em pacientes com epilepsia refratária é delimitar a zona epileptogênica (ZE), área do encéfalo capaz de gerar crises e cuja ressecção tem o potencial para abolir ou reduzir as crises do paciente¹. Neste sentido, há um grande esforço no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas diagnósticas não invasivas que possam localizar a ZE com precisão, buscando evitar ou diminuir a utilização de métodos invasivos, de custo e risco elevados.

Uma técnica diagnóstica que tem recebido renovada atenção é a Imagem de Fontes Eletroencefalográficas (IFE). O uso dessa técnica se baseia no fato de que a localização da área do encéfalo geradora das descargas interictais (zona irritativa) guarda próxima relação com a ZE. A técnica consiste na solução do Problema Inverso do eletromagnetismo, descrito por Helmholtz em 1853, aplicado sobre os dados da eletroencefalografia². O problema inverso sobre os dados de EEG é um problema mal posto, pois, existem infinitas configurações para as fontes elétricas presentes no interior do cérebro que podem gerar os potenciais elétricos detectados no escalpo. Portanto, é preciso utilizar um método de regularização para que se obtenham soluções com sentido físico neurofisiológico para uma distribuição de potencial elétrico medida pelo EEG.

Existem muitos métodos que se propõem a regularizar o problema inverso possibilitando assim sua solução. De forma geral, os métodos podem ser classificados em dois grandes grupos de acordo com a distribuição espacial das fontes que contém a solução: a) modelos de fontes distribuídas, em que a fonte elétrica obtida como solução do PI é dada como uma região com extensão tridimensional no cérebro; e b) os dipolos equivalentes, os quais assumem um vetor único como um dipolo elétrico que representa através do seu centro de massa a região geradora da atividade detectada (veja caso ilustrativo na Figura 1). Alguns exemplos de métodos baseados em fontes distribuídas são: LORETA (*Low resolution electromagnetic tomography*)³, LAURA (*Local Autorregressive Average*)^{4,5}, e BMA (*Bayesian Model Averaging*)⁶, enquanto que o exemplo mais conhecido da segunda forma de solução é o próprio modelo de dipolos equivalentes⁷.

Estudos recentes têm sugerido que a IFE tem um potencial para determinar a localização da ZI similar à magnetoencefalografia⁸. Nesta revisão, faremos uma análise dos estudos recentes utilizando essa técnica na localização da ZE de pacientes com epilepsia focal refratária.

MÉTODOS

Estratégia de procura e critérios de inclusão e exclusão

Estudos foram identificados utilizando o banco de dados MEDLINE. Revistas importantes da área de Neurologia,

incluindo *Annals of Neurology*; *Brain*; *Epilepsia*; *Epilepsy Research*; *Journal of Neurology*, *Neurosurgery and Psychiatry*; *Lancet Neurology*; *Neuroimaging*; *Neurology*; and *Seizure*, foram procuradas para identificar estudos avaliando o uso diagnóstico da IFE. Foram incluídos somente estudos realizados em pacientes submetidos à avaliação pré-cirúrgica de pacientes com epilepsia refratária, tanto em adultos quanto em crianças.

Os estudos deveriam incluir uma tabela com os dados dos pacientes e deveriam ter incluído pelo menos 10 pacientes no estudo.

Análise dos dados

Após os estudos serem identificados, os dados foram extraídos por um dos autores para análise (TRV). As seguintes informações foram extraídas do estudo:

- *Detalhes da amostra*: autor, data da publicação, número de pacientes incluídos no estudo, idade, e se os estudos incluíram somente pacientes livres de crise. O tipo de pacientes incluído nos estudos foi determinado e os estudos identificados como segue: (i) estudos incluindo somente pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT); (ii) estudos incluindo somente pacientes com epilepsia extratemporal (ExTLE); (iii) estudos incluindo ambos os tipos de epilepsia; e (iv) estudos incluindo exclusivamente pacientes com imagem de ressonância magnética normal (IRM normal).
- *Detalhes do teste*: foram determinados o “gold standard” utilizado para determinar a acurácia da IFE, o número de estudos com um estudo positivo e o número de estudos que corretamente identificaram a ZE de acordo com o “gold standard”. Finalmente, foi determinado o número de eletrodos utilizados para adquirir o sinal de EEG e classificados em 3 grupos como se segue. Estudos que utilizaram de 128 a 256 canais foram classificados como IFE de alta densidade e estudos que incluíram menos de 64 canais classificados como IFE de baixa intensidade. Estudos que incluíram entre 64 e 128 canais foram classificados como de densidade intermediária.

Análise da acurácia diagnóstica

Para calcular a acurácia diagnóstica da IFE nós dividimos o número de testes que corretamente identificaram a ZE pelo número total de testes realizados. Os intervalos de confiança de 95% das proporções foram calculados utilizando-se o procedimento de Wilson para correção de continuidade⁹. Se os estudos eram homogêneos o bastante em relação ao grupo de pacientes incluídos, métodos para agrupamento de estudos de acurácia diagnóstica foram usados¹⁰.

RESULTADOS

De acordo com os critérios de busca, 15 estudos, totalizando 312 pacientes reportaram o uso da IFE na determinação da zona epileptogênica em pacientes com epilepsia refratária sendo submetidos à avaliação pré-cirúrgica^{5,11-22}. Foram encontrados 3 estudos que incluíram somente pacientes com ELT, 3 estudos que incluíram somente pacientes com ExTLE, 2 estudos que incluíram somente pacientes com IRM normal e 7 estudos que incluíram pacientes com ELT e ExTLE (Tabela 1).

A acurácia geral da IFE, considerando todos os grupos de pacientes, foi de 79% (95% CI 74 a 83%), mas sofreu um impacto significativo quando determinado tipo de paciente foi incluído no estudo. A acurácia da IFE em estudos incluindo somente pacientes com ELT foi de 60% (40/67), comparado com 83% (156/188) em pacientes que incluíram tanto pacientes com ELT quanto ExT e 92% (34/37) em estudos que incluíram somente pacientes com ExT ($p<0.001$, Chi-quadrado). Estudos que utilizaram mais de 128 eletrodos (alta densidade) foram significativamente mais acurados que estudos que incluíram menos de 64 eletrodos (baixa densidade) ($p=0.047$, Teste exato de Fisher). Estudos que incluíram somente crianças reportaram uma acurácia maior para a IFE (68 vs 92%, $p=0.012$, Teste Exato de Fisher).

DISCUSSÃO

O objetivo da avaliação pré-cirúrgica é determinar a localização da zona epileptogênica, a área do córtex responsável pela geração das crises. Os epileptologistas usam uma variedade de testes diagnósticos para esse propósito, incluindo a ressonância magnética, a análise da semio-logia ictal, do eletroencefalograma interictal e ictal, a to-mografia por emissão de pósitrons. Nessa revisão procuramos determinar qual a acurácia da Imagem por Fontes Eletroencefalográficas (IFE). A acurácia média do teste foi de 79%, bastante similar à acurácia da Imagem por Fontes Magnéticas reportada na literatura, que é de aproximadamente 77%²³⁻²⁶. Estudos que incluíram somente crianças reportaram uma acurácia maior para a IFE (68 vs 92%, $p=0.012$). Entretanto, é preciso ressaltar que os adultos incluídos nos estudos eram predominantemente pacientes com ELT, e os pacientes pediátricos apresentavam exclusi-vamente epilepsia extratemporal. A acurácia no caso das crianças poderia ser influenciada pela menor distância dos eletrodos à fonte e a menor dimensão do espaço de soluções.

Estudos recentes têm sustentado a tese de que a sensibilidade e especificidade da IFE são maiores quando o sinal de EEG é adquirido com um grande número de eletrodos (128-256 canais)¹³. Os achados da revisão suportam essa tese, já que a acurácia da IFE nos estudos

Tabela 1. Resumo dos estudos incluídos na análise.

Estudo	N eletrodos	Grupo	Idade	Gold-standard	Livre de crises	Localizados	Total	Acurácia
Oliva et al, 2010	< 64	TLE	Adultos	Combinação	Não	21	34	61,76%
Gavaret et al, 2004	64 a 128	TLE	Ambos	SEEG	Não	9	20	45,00%
Sperli et al, 2006	< 64	TLE	Crianças	Local da Cirurgia	Sim	10	13	76,92%
Brodbeck et al, 2011	> 128	TLE + EXTLE	Ambos	Local da Cirurgia	Não	45	52	86,54%
Brodbeck et al, 2009	> 128	TLE + EXTLE	Ambos	Local da Cirurgia	Não	12	14	85,71%
Coutin-Churchman et al, 2011	< 64	TLE + EXTLE	Ambos	Local da Cirurgia	Não	23	34	67,65%
Michel et al, 2004	> 128	TLE + EXTLE	Ambos	Combinação	Não	29	32	90,63%
Sperli et al, 2004	< 64	TLE + EXTLE	Ambos	Combinação	Não	27	30	90,00%
Koessler et al, 2010	64 a 128	TLE + EXTLE	Adultos	SEEG	Não	9	10	90,00%
Lantz et al, 2003	> 128	TLE + EXTLE	Ambos	RM	Não	11	16	68,75%
Gavaret et al, 2006	64 a 128	EXTLE	Ambos	SEEG	Não	7	10	70,00%
Mirkovic et al, 2003	< 64	EXTLE	Crianças	RM	Não	10	10	100,00%
Sperli et al, 2006	< 64	EXTLE	Crianças	Local da Cirurgia	Sim	17	17	100,00%
Brodbeck et al, 2010	> 128	RM normal	Ambos	Local da Cirurgia	Sim	8	10	80,00%
Holmes et al, 2010	> 128	RM normal	Ambos	SEEG	Não	8	10	80,00%
Total						246	312	78,85%

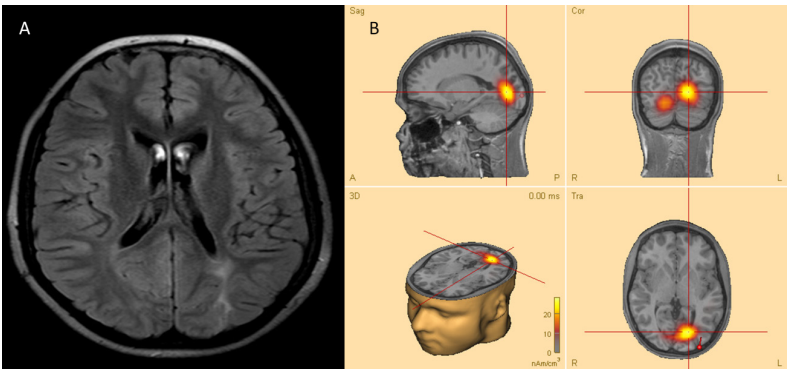


Figura 1. (A) Caso ilustrativo evidenciando área de diminuição de volume e hipersinal em substância branca occipital esquerda. (B) Imagem de fontes eletroencefalográficas revelou que a provável origem dos spikes interictais do paciente é a porção mesial do lobo occipital esquerdo.

que incluíram menos de 64 eletrodos foi menor que a acurácia nos estudos que incluíram mais de 128 eletrodos (75 vs 85%, $p=0.047$, Teste exato de Fisher).

Um dos principais achados da revisão é o de que a acurácia da IFE em pacientes com ELT é significativamente inferior à acurácia em pacientes com epilepsia extratemporal (60 vs 92%, $p<0.001$). Esses achados não podem ser explicados pelo uso de um número maior de eletrodos, já que tanto os estudos que incluíram pacientes com ELT quanto aqueles que incluíram pacientes com epilepsia ExT utilizaram um número pequeno de eletrodos (<64).

Em conclusão, a Imagem por Fontes Eletroencefalográficas é uma ferramenta promissora na determinação da zona epileptogênica de pacientes com epilepsia refratária, aparentemente útil principalmente em pacientes com epilepsia extratemporal.

REFERÊNCIAS

- Rosenow F, Luders H. Presurgical evaluation of epilepsy. *Brain* 2001;124:1683-700.
- Helmholtz HLF. Ueber einige Gesetze der Vertheilung elektrischer Ströme in körperlichen Leitern mit Anwendung auf die thierisch-elektrischen Versuche. *Ann Physik und Chemie* 1853;9:211-33.
- Pascual-Marqui RD, Michel CM, Lehmann D. Low resolution electromagnetic tomography: a new method for localizing electrical activity in the brain. *Int J Psychophysiol* 1994;18:49-65.
- Grave de Peralta MR, Gonzalez AS, Lantz G, Michel CM, Landis T. Noninvasive localization of electromagnetic epileptic activity. I. Method descriptions and simulations. *Brain Topogr* 2001;14:131-7.
- Lantz G, Grave de Peralta MR, Gonzalez AS, Michel CM. Noninvasive localization of electromagnetic epileptic activity. II. Demonstration of sublobar accuracy in patients with simultaneous surface and depth recordings. *Brain Topogr* 2001;14:139-47.
- Trujillo-Barreto NJ, Aubert-Vazquez E, Valdes-Sosa PA. Bayesian model averaging in EEG/MEG imaging. *Neuroimage* 2004;21:1300-19.
- Scherg M. Fundamentals of dipole source potential analysis. In: Grandori F, Romani G, editors. Auditory evoked electric and magnetic fields. Topographic mapping and functional localization. *Advances in audiology*; 1990. p. 40-69.
- Plummer C, Harvey AS, Cook M. EEG source localization in focal epilepsy: where are we now? *Epilepsia* 2008;49:201-18.
- Newcombe RG. Interval estimation for the difference between independent proportions: comparison of eleven methods. *Stat Med* 1998;17:873-90.
- Fleiss JL. The statistical basis of meta-analysis. *Stat Methods Med Res* 1993;2:121-45.
- Brodbeck V, Lascano AM, Spinelli L, Seeck M, Michel CM. Accuracy of EEG source imaging of epileptic spikes in patients with large brain lesions. *Clin Neurophysiol* 2009;120:679-85.
- Brodbeck V, Spinelli L, Lascano AM, Pollo C, Schaller K, Vargas MI et al. Electrical source imaging for presurgical focus localization in epilepsy patients with normal MRI. *Epilepsia* 2010;51:583-91.
- Brodbeck V, Spinelli L, Lascano AM, Wissmeier M, Vargas MI, Vulliemoz S et al. Electroencephalographic source imaging: a prospective study of 152 operated epileptic patients. *Brain* 2011;134:2887-97.
- Gavaret M, Badier JM, Marquis P, Bartolomei F, Chauvel P. Electric source imaging in temporal lobe epilepsy. *J Clin Neurophysiol* 2004;21:267-82.
- Gavaret M, Badier JM, Marquis P, McGonigal A, Bartolomei F, Regis J et al. Electric source imaging in frontal lobe epilepsy. *J Clin Neurophysiol* 2006;23:358-70.
- Holmes MD, Tucker DM, Quiring JM, Hakimian S, Miller JW, Ojemann JG. Comparing noninvasive dense array and intracranial electroencephalography for localization of seizures. *Neurosurgery* 2010;66:354-62.
- Koessler L, Benar C, Maillard L, Badier JM, Vignal JP, Bartolomei F et al. Source localization of ictal epileptic activity investigated by high resolution EEG and validated by SEEG. *Neuroimage* 2010;51:642-53.
- Lantz G, Spinelli L, Seeck M, Peralta Menendez RG, Sottas CC, Michel CM. Propagation of interictal epileptiform activity can lead to erroneous source localizations: a 128-channel EEG mapping study. *J Clin Neurophysiol* 2003;20:311-9.
- Michel CM, Lantz G, Spinelli L, De Peralta RG, Landis T, Seeck M. 128-channel EEG source imaging in epilepsy: clinical yield and localization precision. *J Clin Neurophysiol* 2004;21:71-83.
- Mirkovic N, Adjouadi M, Yaylali I, Jayakar P. 3-d source localization of epileptic foci integrating EEG and MRI data. *Brain Topogr* 2003;16:111-9.
- Oliva M, Meckes-Ferber S, Roten A, Desmond P, Hicks RJ, O'Brien TJ. EEG dipole source localization of interictal spikes in non-lesional TLE with and without hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res* 2010;92:183-90.
- Sperli F, Spinelli L, Seeck M, Kurian M, Michel CM, Lantz G. EEG source imaging in pediatric epilepsy surgery: a new perspective in presurgical workup. *Epilepsia* 2006;47:981-90.
- Kaiboriboon K, Nagarajan S, Mantle M, Kirsch HE. Interictal MEG/MSI in intractable mesial temporal lobe epilepsy: spike yield and characterization. *Clin Neurophysiol* 2010;121:325-31.
- Knowlton RC, Elgavish R, Howell J, Blount J, Burneo JG, Faught E et al. Magnetic source imaging versus intracranial electroencephalogram in epilepsy surgery: a prospective study. *Ann Neurol* 2006;59:835-42.
- Otsubo H, Snead OC, III. Magnetoencephalography and magnetic source imaging in children. *J Child Neurol* 2001;16:227-35.
- Stefan H, Hummel C, Scheler G, Genow A, Druschky K, Tilz C et al. Magnetic brain source imaging of focal epileptic activity: a synopsis of 455 cases. *Brain* 2003;126:2396-405.

Endereço para correspondência:

Tonicarlo Rodrigues Velasco
Campus Universitário Monte Alegre – 4º andar CIREP
CEP 14090-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil
E-mail: tvelasco@fmrp.usp.br

Courses, Symposia & Seminars

*Journal of
Epilepsy and
Clinical
Neurophysiology*

J Epilepsy Clin Neurophysiol 2012; 18(4):132

Vai acontecer

■ **June 23rd-27th, 2013 – Montreal, Canadá**
30th INTERNATIONAL EPILEPSY CONGRESS

Local: Montreal, Canadá

© 2013 ILAE/IBE Congress Secretariat:

7 Priory Hall, Stillorgan, Dublin 18, Ireland

Phone: +353 1 205 6720 – Fax: +353 1 205 6156

E-mail: montreal@epilepsycongress.org

Informações: <http://www.epilepsymontreal2013.org/>

■ **2013 – LASSE VII – SEIZURES AND EPILEPSIES IN THE TROPICS**

Inscrições: estarão abertas a partir de 01 de outubro de 2012

Informações: www.lasse.med.br

JECN **Informações da Secretaria**

Prezado Sócio!

O *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology (JECN)* continua a campanha junto aos seus sócios e colaboradores solicitando a colaboração para o envio artigos originais, de revisão, relatos de casos, cartas e notícias sobre Epilepsia e áreas afins para divulgação.

PARTICIPE!

Enviar para:

Fernando Cendes (Editor)

E-mail: [<fcendes@unicamp.br>](mailto:fcendes@unicamp.br)

The Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology publish voluntary articles or articles requested by the editors on topics related to Epilepsy and Clinical Neurophysiology. All contributions should be submitted the Editorial Council for acceptance. The text can be either in Portuguese, English or Spanish.

Contributions to be considered for publication:

- **Review articles:** should present the main ideas and facts about a specific topic, seeking for controversial findings in the literature and not be just a simple description of it. The author should criticize the methodology and present his/her own interpretation of the data. Should be divided into sections headed Introduction, Objectives, Methods, Results and Conclusion.
- **Original articles:** should present new results of experimental and theoretical research and should be divided into sections headed Introduction, Objectives, Methods, Results and Conclusion.
- **Special articles:** will be published when determined by the editors.
- **Essays:** should present an original interpretation of data and concepts of public domain in order to critically contribute to a particular knowing. Maximum length 500 words.
We do not accept articles previously published in other journals.
- **Letters to the Editor:** should be brief and comment only on material published in the journal. In case of criticism, replying will be allowed. Letters may be reduced.
- **News:** of LBE interest should be sent to the Editorial Council. Maximum length 100 words.
- **Brief communications:** should present brief reports on research results which have reached a stage where they are ready for preliminary communication or case reports of particular relevance.

The J Epilepsy Clin Neurophysiol also accepts information about events, publications of diverse subjects, in any field, which in some way could interest those involved with Epilepsy, epileptic patients or clinical neurophysiology.

Three copies of each article should be sent containing:

- 1 – On the first page: the full title of the paper; the full name of the authors; the department(s) and institution(s) where the work was carried out, the name and the address of the main author correspondence.
- 2 – On the second page: Abstract – of approximately 200 words presenting concisely the objectives, the methodology and conclusion for original articles and the most important findings for review articles and essays. Keywords – a list of 3 to 5 words for indexing purposes should be provided.
- 3 – Further pages: the pages should be numbered consecutively.

Acknowledgements should be included on the last page. References should be identified in the text by arabic numerals in parenthesis, a number for each reference and be listed alphabetically by the last name of the first author.

- 4 – References should be sent separately in accordance to the International Committee of Medical Journal Editors (Ann Intern Med 1997;126:36-47) or at Internet <<http://www.acponline.org>>.
- 5 – Illustration should be sent loosely in a separate envelope. They should not exceed 25% of the space of whole article. Photographs should be in glossy paper in size of 12×8 cm and should indicate on the back with a pencil the title of the article, its sequence and position. Each should have an explanatory caption typed on a separate sheet. Digitalized pictures should have a minimum definition of 600 dpi and be send as a jpeg or tif file. Tables and graphics can be typed and should have their position indicated in the text. Full-collor illustrations and photographs will be charged to the author.
- 6 – The text of the articles should be provided as a Word for Windows, in 12 Times New Roman font, A4 paper size, double-spacing and margins of 3 cm. The lenght of the paper is limited to 8 pages including tables, illustrations, bibliography, etc.
- 7 – Review – papers will be submitted to a stylistics review. Proofs will be sent to authors and should return by fax in 24-48 hours.
- 8 – Authorization – material copied from other sources should be accompanied by a written consent for reproduction. It is the author's responsibility to provide it.
- 9 – Offprints – After september 2008 edition, the JECN won't supply offprints of the articles. Same will be supplied to the authors in PDF file in the journal format final.
- 10 – Eletronic media: All articles published in the paper version of the JECN will also be published in an electronic version, in PDF format, on the Liga Brasileira de Epilepsia website. The home page address for the JECN on the LBE website is <www.epilepsia.org.br/jecn>.



In the electronic version, besides the PDF contents, it is possible to publish videos in digital format. These videos should be in AVI format, using standard Windows codecs (the video must be viewable in any Windows system with no digitalizing card). The maximum allowed duration for each video is 3 minutes, and the recommended size is 240×180 pixels. The videos should be sent in a CD-ROM along with the rest of the material.

Advertising:

Comercial ads are accepted. Please contact the LBE for informations <www.epilepsia.org.br/jecn>.

The articles as the advertisements should be sent to Editor, Dr. Fernando Cendes, Department of Neurology, FCM, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil – E-mail: <fcendes@unicamp.br>.

Contributors and advertisers are responsible for the scientific content and the views expressed. Editorial changes in the format will not be usually communicated.

The J Epilepsy Clin Neurophysiol is indexed in the ISSN nº 1676-2649 and indexed in Latin-American Index Medicus (LILACS), in CNPq (The Brazilian Institute Information), in CCN-IBICT, in Excerpta Medical/Eletronic Publishing Division, Elsevier Science Publishers.

Normas para Publicação

A Revista de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica (J Epilepsy Clin Neurophysiol) publica artigos enviados espontaneamente ou por solicitação dos editores e aprovados pelo Conselho Editorial, abordando assuntos relacionados à Epilepsia e Neurofisiologia Clínica.

Serão considerados:

- **Artigos de revisão:** devem reunir os principais fatos e ideias de um determinado tema, buscando achados contróvertidos na literatura, e não somente sua descrição pura e simples. Critique a metodologia e apresente sua própria interpretação das informações. Devem incluir Introdução, Objetivo(s), Métodos, Resultados e Conclusão.
- **Artigos originais:** devem conter resultados novos de pesquisa experimental ou teórica. Devem incluir Introdução, Objetivo(s), Métodos, Resultados e Conclusão.
- **Artigos especiais:** são artigos determinados pelos Editores, escritos por pesquisadores eminentes.
- **Ensaio:** devem conter interpretação original de dados e conceitos de domínio público de forma a contribuir criticamente a um determinado conhecimento. Não devem exceder 500 palavras.
Não aceitamos artigos que já tenham sido previamente publicados em outros periódicos.
- **Cartas:** textos breves e objetivos relativos às publicações do JECN. Nos casos de crítica, será dado o direito de resposta. As cartas poderão ter sua forma abreviada.
- **Notícias:** de interesse da LBE, com até 100 palavras.
- **Comunicações breves:** atualizações sobre relatos de pesquisas em estágio avançado, com resultados próximo de ser divulgados, ou relatos de casos de especial importância.

O J Epilepsy Clin Neurophysiol também aceita informações sobre eventos, publicações ou assuntos diversos, de qualquer área, que de alguma forma, interessem a todos aqueles envolvidos com epilepsia ou com o paciente epilético e com neurofisiologia clínica.

Os artigos devem ser enviados em três vias e conter:

- 1 – Na primeira página: título do artigo, nome completo do autor, instituição onde o trabalho foi realizado e endereço do principal autor para correspondência.
- 2 – Na segunda página: Resumo – com até 200 palavras, estruturado nos itens: objetivos, metodologia, resultados e conclusões (artigos originais). Em artigos de revisão e ensaios devem ser descritos os achados mais importantes. Unitermos – de 3 a 5 palavras que identifiquem o tema apresentado e que sejam úteis para indexação. Procure utilizar termos listados pelos Descritores em Ciência da Saúde (DeCs), editado anualmente pela BIREME/OPAS/OMS, São Paulo.
Abstract – uma versão correta do resumo para a língua inglesa, com unitermos em inglês (keywords).
- 3 – Páginas subsequentes: texto do artigo em páginas numeradas, sendo que na última podem ser incluídos os agradecimentos pertinentes. Citações no texto deverão ser feitas através de números entre parênteses, um número para cada referência, dispostas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor.
- 4 – Referências devem ser enviadas separadas do texto, seguindo normas do Comitê Internacional de Editoras de Revistas Médicas (Ann Intern Med 1997;126:36-47 – BJECN 1997;(3)4:162-173 ou na Internet <<http://www.acponline.org>>.
- 5 – As ilustrações devem ser enviadas em envelopes à parte, sendo que o total das mesmas não deverá exceder a 1/4

do espaço ocupado pelo artigo (no máximo 05 fotos): as fotografias, em papel brilhante e em dimensões de 12×8 cm, devem conter no verso e a lápis, o título do artigo, sua sequência e posição, acompanhadas das respectivas legendas, em folha separada. No caso de fotos digitalizadas, estas devem ter definição mínima de 600 dpi e serem enviadas em arquivo separado do artigo nos formatos jpeg ou tif. Os gráficos e as tabelas poderão ser digitadas e suas posições indicadas no texto. Ilustrações e fotos coloridas serão cobradas dos autores.

- 6 – O texto dos artigos deverá ser digitado no programa Word para Windows, na fonte Times New Roman, corpo 12, papel formato A4, espaço duplo e margens de 3 cm. Máximo de 08 páginas por artigo (incluindo tabelas, ilustrações, bibliografia, etc.). Enviar além das 3 vias impressas, cópias em disquete, CD ou DVD.
- 7 – Revisão dos originais: os artigos serão submetidos à revisão linguística antes da publicação. As provas gráficas serão enviadas ao autor e devem ser devolvidas em 24 horas com as correções pertinentes.
- 8 – Autorização – material copiado de outras fontes deve ser acompanhado por autorização escrita para reprodução, sendo responsabilidade do autor obter tal permissão.
- 9 – Separatas – A partir da edição de setembro de 2008, o JECN não fornecerá separatas dos artigos, os mesmos serão enviados aos autores em arquivo PDF no formato final da revista.
- 10 – Revista eletrônica – Os artigos publicados na versão em papel do JECN serão também publicados em versão eletrônica, no formato PDF, no site da Liga Brasileira de Epilepsia. A home-page do JECN no site da LBE é <www.epilepsia.org.br/jecn>.



Na versão eletrônica, além do conteúdo do PDF, é possível publicar vídeos em formato digital. Esses vídeos deverão estar em formato AVI, utilizando codecs padrão do windows (o vídeo deve poder ser aberto em qualquer computador com windows que não possua placa digitalizadora de vídeo). A duração máxima do vídeo é de 3 minutos e o tamanho recomendado é de 240×180 pixels. Os vídeos deverão ser enviados em CD-ROM juntamente com o restante do material.

Anúncios:

O J Epilepsy Clin Neurophysiol aceita anúncios de natureza comercial. Para informações, entrar em contato com a LBE <www.epilepsia.org.br/jecn>.

Os artigos e/ou anúncios deverão ser enviados ao Editor Executivo, Dr. Fernando Cendes, Departamento de Neurologia, FCM, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil – E-mail: <fcendes@unicamp.br>.

A LBE não se responsabiliza por opiniões ou conceitos emitidos nesta publicação em artigos ou anúncios de responsabilidade especificada. Alterações editoriais de forma não serão comunicadas aos autores.

O J Epilepsy Clin Neurophysiol é catalogado no ISSN sob o nº 1676-2649, indexado no Index Medicus Latino-Americano (LILACS), no Instituto Brasileiro de Informação em Ciências e Tecnologia (CNPq), no Catálogo Coletivo Nacional de Periódicos do IBICT, na Excerpta Medica/Electronic Publishing Division, Elsevier Science Publishers.