



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
Professor Aloísio Teixeira



**EFEITOS DA MALFORMAÇÃO CORTICAL E CONVULSÕES POR
HIPERTERMIA NA MIELINIZAÇÃO E SUA RELAÇÃO COM A
HIPEREXCITABILIDADE CEREBRAL**

DÉBORA MAGALHÃES PORTELA

MACAÉ
FEVEREIRO DE 2022

Débora Magalhães Portela

EFEITOS DA MALFORMAÇÃO CORTICAL E CONVULSÕES POR HIPERTERMIA NA
MIELINIZAÇÃO E SUA RELAÇÃO COM A HIPEREXCITABILIDADE CEREBRAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
do Rio de Janeiro – Campus Macaé como
requisito para obtenção do título de
farmacêutico

Orientador: Prof. Dr. Henrique Rocha Mendonça

MACAÉ
FEVEREIRO DE 2022

CIP - Catalogação na Publicação

P843

Portela, Debora Magalhães

Efeitos da malformação cortical e convulsões por hipertermia na mielinização e sua relação com a hiperexcitabilidade cerebral / Debora Magalhães Portela - Macaé, 2019.

116 f.

Orientador(a): Henrique Rocha Mendonça.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas , Bacharel em Farmácia, 2022.

1. Cortical – malformação. 2. Esquizencefalia. 4. Oligodendrócitos. 3. Mielina.
I. Mendonça, Henrique Rocha, orient. II. Título.

CDD 615

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Campus UFRJ-Macaé Professor Aloisio Teixeira Bibliotecário:

Anderson dos Santos Guarino CRB7 – 5280

Débora Magalhães Portela

Efeitos da malformação cortical e convulsões por hipertermia na mielinização e sua relação com a hiperexcitabilidade cerebral

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 01 de 02 de 2022.

Comissão avaliadora:

Prof. Dr. Henrique Rocha Mendonça (Presidente da Banca)

UFRJ/Campus Macaé

Link currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5626482657911002>

Prof. Dr. Carlos Humberto Andrade Moraes

UFRJ/Campus Macaé

Link currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6621554150191440>

Prof. Dra. Sheila Espírito Santo Araújo

UENF

Link currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9491350545200146>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das vesículas primárias do sistema nervoso em desenvolvimento.....	9
Figura 2: Histogênese do córtex cerebral.....	11
Figura 3: Figura representativa da bainha de mielina.....	13
Figura 4: Imagem representativa das camadas corticais.....	14
Figura 5: Esquemas das Malformações do Espectro da Polimicrogiria (MEP).....	18
Figura 6: Imagem de Ressonância Magnética Representativa dos Tipos de Esquizencefalia.....	19
Figura 7: Esquema das regiões encefálicas analisadas.....	x
Figura 8: Tempo para o início da CH.....	32
Figura 9: Temperatura corporal em que o animal sofre a CH.....	32
Figura 10: Latência para morrer após indução de convulsão.....	33
Figura 11: Fases da Escala de Racine modificada.....	34
Figura 12: Latência para convulsão após injeção de 50 mg/kg de PTZ.....	35
Figura 13: Duração das crises após injeção de 50 mg/kg de PTZ.....	35
Figura 14: Aspecto da mielinização na região da ESQ.....	36
Figura 15: Quantidade de OLGs na SC adjacente à lesão.....	38
Figura 16: Mielinização na SC adjacente à lesão.....	39
Figura 17: Quantidade de OLGs na SB abaixo da lesão.....	41
Figura 18: Mielinização na SB abaixo da lesão.....	42
Figura 19: Quantidade de OLGs no CC.....	43
Figura 20: Mielinização no CC.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Especificações dos anticorpos primários	30
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico
CC	Corpo Caloso
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CH	Convulsão Hipertérmica
CMV	Citomegalovírus
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPN	Dia pós-natal
EEG	Eletroencefalograma
ESQ	Esquizencefalia
ESQ + CH	Esqueuzencefalia + Convulsão Hipertérmica
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GABA-A	Ácido Gama-aminobutírico tipo A
GABA-B	Ácido Gama-aminobutírico tipo B
IRM	Imagens de Ressonância Magnética
LFB	Luxol Fast Blue
MBP	Proteína Básica de Mielina
MEP	Malformações do Espectro da Polimicrogiria
MG	Microgiria
NMDA	N-metil-D-aspartato
PFA	Parafarmaldeído
PEPS	Potenciais Excitatório Pós-sinápticos
PIPS	Potenciais Inibitórios Pós-sinápticos
PMG	Polimicrogiria
PTZ	Pentilenotetrazol
OLG	Oligodendrócitos
OPC	Células Progenitoras de Oligodendrócitos
SB	Substância Branca
SC	Substância Cinzenta
SNC	Sistema Nervoso Central
TRPV1	Receptor Transitório Vanilóide tipo 1

SUMÁRIO

1 RESUMO	8
2 INTRODUÇÃO.....	9
2.1 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central	9
2.1.1 Desenvolvimento do Neocórtex	10
2.1.2 Mielinização	12
2.1.3 Estrutura, Função e Distribuição Celular do Neocórtex e Substância Branca	14
2.2 Plasticidade Cerebral	16
2.6 Malformações do Espectro da Polimicrogiria	17
2.7 Convulsão Febril	22
3 JUSTIFICATIVA	24
4 OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivos Gerais	27
4.2 Objetivos Específicos	27
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
5.1 Animais.....	28
5.2 Indução da Malformação	28
5.3 Indução da Convulsão Hipertérmica	28
5.4 Teste de Probabilidade e Gravidade de Convulsões.....	28
5.5 Imunohistoquímica	29
5.6 Histologia por Luxol Fast Blue	30
5.7 Análises Estatísticas	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1 Suscetibilidade do animal com ESQ sofrer uma CH.....	31
6.2 Análise da severidade de convulsões por PTZ	32
6.3 Aspecto da mielinização na região lesionada por coloração com Luxol Fast Blue (LFB)	
36	
6.4 Avaliação da mielinização por IHQ	37
6.4.1 Intensidade de mielinização e número de OLGs na SC adjacente à lesão	37
6.4.2 Intensidade de mielinização e número de OLGs na SB abaixo da lesão	39
6.4.3 Intensidade de mielinização e número de OLGs no CC.....	42
7 CONCLUSÃO	45
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 RESUMO

Introdução: Malformações corticais durante o desenvolvimento induzem atividade epileptiforme. A excitabilidade é alterada, aumentando atividade recorrente na zona epileptogênica. Convulsões surgem quando há alteração nos mecanismos que equilibram a excitação e inibição. Interromper os mecanismos que inibem a neurotransmissão ou promover os mecanismos que a facilitam, potencializa a ativação da circuitaria e pode levar a convulsões. Uma característica estrutural que pode auxiliar na potencialização da condução do sinal é a mielinização, pois ela é responsável pela maximização da velocidade de condução.

Objetivos: Investigar a mielinização e a excitabilidade cerebral de camundongos com malformação cortical.

Materiais e métodos: Para testar isso, utilizamos 4 grupos experimentais: (1ESQ) - induzimos esquizencefalia em camundongos *Swiss*, no dia pós-natal (DPN)1 encostando uma sonda a -55°C sobre o crânio, na região parieto-occipital por 5 seg; (2 ESQ + CH) - no DPN12, animais submetidos à lesão, foram submetidos à convulsão hipertérmica por exposição a temperatura de 47-48°C até o aparecimento de uma convulsão tônico-clônica generalizada; (3 CH) – convulsão hipertérmica também foi realizada em animais que não sofreram lesão; (4 CT) – animais não submetidos a procedimentos foram considerados controles. Para realizar, de acordo com a escala de Racine, uma análise comportamental da severidade das convulsões no DPN100, os animais receberam injeção intraperitoneal do convulsivante pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista de GABA-A em doses convulsivante (50 mg/kg) ou letal (80 mg/kg). Por fim, os encéfalos foram coletados para realização de imunohistoquímica para verificar mielinização (anti-MBP) e número de oligodendrócitos (anti-CC1) no corpo caloso (CC) e nas substâncias, branca (SB) e cinzenta (SC) do córtex parieto-occipital. A diferença foi testada utilizando o teste one-way ANOVA seguido de teste de Tukey. Resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$. Esses experimentos foram aprovados no CEUA UFRJ-Macacé sob o protocolo 0043.

Resultados e discussão: Por meio de análises comportamentais, nossos resultados mostram que no DPN12 a latência até o grupo ESQ apresentar convulsão hipertérmica é menor que o CT. Já na fase adulta (DPN100), após indução de convulsão por PTZ, em dose letal os dados mostram que a latência para a morte dos grupos CH, ESQ e ESQ + CH, é menor comparada ao grupo CT. Já a análise de dose convulsivante mostrou que os animais lesionados (ESQ) entram mais rápido e permanecem mais tempo em convulsões graves comparados aos animais normais. Já os dados imunohistoquímicos revelam que os grupos lesionados, ESQ e ESQ + CH, possuem aumento de oligodendrócitos (células CC1+) em todas as regiões analisadas, SC, SB e CC, comparados ao CT. Ademais, os grupos lesionados possuem aumento de mielinização (intensidade de MBP+) em todas as regiões analisadas SC, SB e CC, quando comparados ao CT.

Conclusão: Os dados sugerem que a ESQ predispõe o cérebro a convulsionar na infância e na idade adulta, bem como induz o aumento da severidade das convulsões. Além disso, promove o aumento de oligodendrócitos e mielinização, sendo possíveis efeitos que levam ao aparecimento de convulsões generalizadas na idade adulta.

Palavras-chave: malformação cortical, esquizencefalia, convulsão febril, mielinização e oligodendrócito

2 INTRODUÇÃO

2.1 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central

Durante a terceira semana de gestação humana o sistema nervoso do embrião começa a se desenvolver através da formação da placa neural pelo folheto embrionário ectoderma. Através da neurulação, a placa neural dará origem ao tubo neural, o qual formará todos os neurônios residentes do Sistema Nervoso Central (SNC). Através do crescimento diferencial da porção cranial do tubo neural, surgem três dilatações denominadas vesículas encefálicas primárias: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (Figura 1). O prosencéfalo diferencia-se em diencéfalo vesículas ópticas e vesículas telencefálicas. As vesículas ópticas formam os nervos ópticos e as retinas. Já as vesículas telencefálicas darão origem aos dois hemisférios cerebrais. Eventos importantes fazem parte do desenvolvimento do telencéfalo, tais como formação dos ventrículos, do bulbo olfatório, das células da parede do telencéfalo e também da substância branca. Os neurônios da parede do telencéfalo se proliferam formando o córtex cerebral e telencéfalo basal. Já o diencéfalo dá origem ao tálamo e ao hipotálamo (BEAR, et al. 2008).

Os axônios dos neurônios do encéfalo em desenvolvimento projetam-se para outras regiões do sistema nervoso para realizar a comunicação neuronal. Esses axônios agrupam-se para formar os três conjuntos de substância branca mais importantes: corpo caloso, substância branca cortical e cápsula interna (BEAR, et al. 2008).

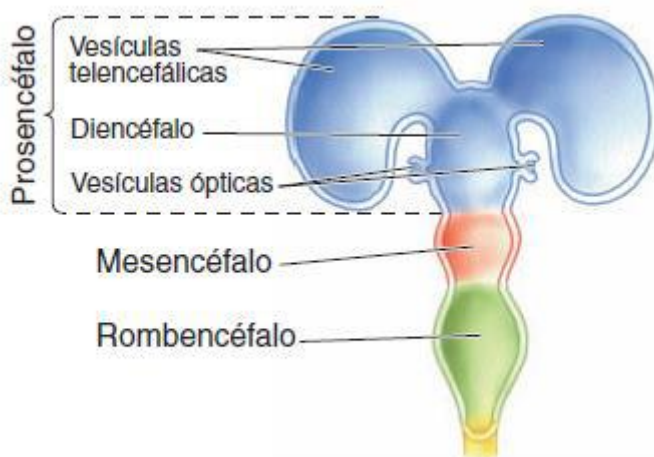


Figura 1: Representação das vesículas primárias do sistema nervoso em desenvolvimento
 Ilustração das vesículas encefálicas primárias. A porção azul representa o prosencéfalo e suas

respectivas diferenciações, vesículas telencefálicas, diencéfalo e vesículas ópticas. Já a porção vermelha indica o mesencéfalo e a verde, o rombencéfalo. Fonte: BEAR, et al. 2008.

2.1.1 Desenvolvimento do Neocórtex

Ao longo da evolução, o córtex é a estrutura encefálica que mais se expande na espécie humana em comparação às demais. Seus neurônios captam as informações sensoriais externas e processam os movimentos voluntários. Um embrião de quatro meses já possui as principais estruturas anatômicas formadas, porém o córtex cerebral ainda é liso. A partir disso, ocorre uma expansão cortical, conseqüentemente o surgimento de sulcos e giros. Neste momento ocorre uma intensa atividade de proliferação, migração e diferenciação neuronal, bem como sinaptogênese, formação de circuitaria, mielinização e eliminação programada de neurônios e sinapses (BEAR, et al. 2008; MACHADO & HAERTEL, 2014).

Juntamente com a formação do tubo neural, nos primeiros estágios do desenvolvimento, ocorre uma intensa proliferação neuronal, os precursores neuronais começam a se dividir de maneira que algumas células saem do ciclo celular formando neurônio jovens, os quais entram no processo de migração na região proliferativa periventricular para a porção mais externa para geração do córtex cerebral. As primeiras células a migrar percorrem uma curta distância e formam uma camada abaixo da superfície pial, chamada pré-placa. Essa camada é composta basicamente por dois tipos celulares: células Cajal-Retzius, que ficam na zona marginal e células da sub-placa. Já na zona ventricular encontra-se células gliais justapostas chamadas glia radial, a qual possui prolongamento que se estende desde a superfície ventricular até a superfície externa, esse prolongamento cria uma trilha de migração. Os neurônios migram aderidos à glia radial em direção à pré-placa, formando a placa cortical. No decorrer da migração vão se formando camadas, de modo que os neurônios novos ultrapassam os outros que já migraram. Assim sendo, criam-se as camadas corticais, primeiramente as mais profundas, seguidas pelas mais superficiais. As Células migratórias se aloca entre as camadas da pré-placa, de forma que a camada mais externa corresponde às células de Cajal-Retzius, e a camada mais interna, às células da Sub-placa (Figura 2). A migração via glia radial é coordenada por substâncias secretadas pelos neurônios que migraram anteriormente, dessa forma eles determinam o movimento de parada (SANES, et al. 2006; MACHADO & HAERTEL, 2014).

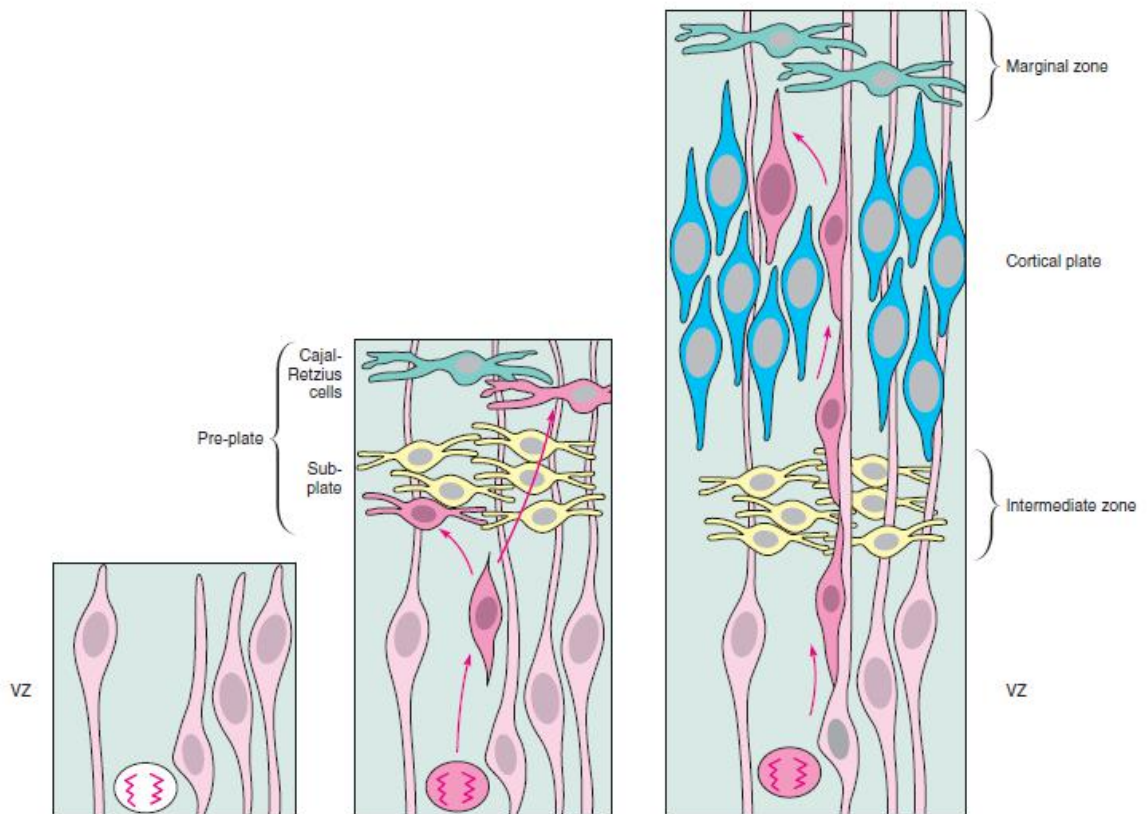


Figura 2: Histogênese do córtex cerebral - Ilustração dos estágios da histogênese do córtex cerebral. O primeiro estágio é composto por células progenitoras que ocupam a Zona Ventricular (VZ). No segundo estágio os primeiros neurônios que saem do ciclo celular (células vermelhas) migram para formar a pré-placa (pre-plate), a qual encontra-se adjacente à superfície pial, sendo composta pelas células mais superficiais, Cajal-Retzius (célula verde) e mais internas, células da sub-placa (subplate). No terceiro estágio novas gerações neuronais (células vermelhas) migram pelo prolongamento da glia radial para formar a placa cortical (cortical plate) que fica entre a camada de células Cajal-Retzius (marginal zone) e a sub-placa (intermediate zone).

Fonte: SANES et al, 2006.

Posteriormente, os neurônios adquirem as devidas características morfológicas e bioquímicas das suas futuras funções e emitem os axônios para os alvos, os quais possuem uma estrutura chamada cone de crescimento que é especializado em tatear o ambiente para conduzir o axônio até o alvo correto, por meio da interação com pistas químicas presentes no ambiente neural. Ao chegar no alvo, o axônio se ramifica e inicia o processo de sinaptogênese. De forma semelhante, a diferenciação dos tipos neuronais é dependente dos fatores presentes no microambiente, podendo ser fatores indutores ou inibidores, estes são secretados por grupos

neuronal e determinam quais genes serão expressos naquela população celular (MACHADO & HAERTEL, 2014).

Após esse período de embriogênese, ocorrem os processos de morte neuronal programada e eliminação de sinapses produzidas em excesso ou com alvos inapropriados. A morte programada é inibida pelo tecido alvo, o qual libera substâncias neurotróficas quando devidamente estimulados. Essas substâncias são transportadas retrogradamente pelos axônios, e sinalizam no soma do neurônio pré-sináptico, bloqueando um processo de apoptose ativo. Portanto, os neurônios sobreviventes são aqueles que conseguem estabilizar sinapses e captar uma quantidade suficiente de neurotrofina para que a atividade apoptótica pare. Esse período de plasticidade natural do desenvolvimento abrange os períodos críticos de plasticidade neuronal, onde o cérebro se mantém em constante transformação. A mielinização é considerada o final da maturação, coincidindo com o fim dos períodos críticos de plasticidade neural. Ela se completa em tempos diferentes de acordo com a região do sistema nervoso, sendo o córtex pré-frontal o último a ser mielinizado. (MACHADO & HAERTEL, 2014).

2.1.2 Mielinização

A mielinização é o processo de formação da bainha de mielina, a qual é responsável pelo aumento da velocidade de condução do potencial de ação. A mielina é uma estrutura especializada produzida por células gliais, as quais emitem prolongamentos citoplasmáticos que envolvem axônios de vários neurônios de maneira espiralada. No SNC, a mielinização é feita pelos oligodendrócitos, cujos progenitores são originados na zona subventricular, onde se dividem e migram para as regiões alvo (EMERY, 2010).

No telencéfalo de roedores, as células progenitoras de oligodendrócitos (OPC) surgem no final da gestação e continuam o processo de proliferação durante as primeiras duas semanas de vida pós-natal. Ainda que o pico de produção de oligodendrócitos seja durante a terceira semana pós-natal, as OPCs persistem como uma população de células gliais residentes distribuídas uniformemente no SNC adulto e mantêm capacidade proliferativa, podendo gerar oligodendrócitos de forma assíncrona ao longo da vida (HILL et al, 2014).

A partir disso, as OPCs diferenciam-se em oligodendrócitos maduros (OLG), que passam a mielinizar axônios próximos. Tanto o desenvolvimento dos OLGs quanto a mielinização são altamente regulados por diferentes mecanismos, tais como ligantes na superfície axonal, moléculas secretadas e atividade neuronal. Curiosamente, a maioria dos ligantes são de inibição, Jagged pela via Notch em OPCs, e PSA-NCAM e LINGO-1, tanto

para inibição da diferenciação de OPCs quanto para mielinização. A sinalização via receptor acoplado a proteína G (GPCR) é importante para regulação da diferenciação de OLGs e da mielinização (EMERY, 2010).

Detalhadamente, a bainha de mielina é uma estrutura espiralada, formada por diversas voltas de uma extensão de membrana plasmática do OLG, localizada no entorno dos axônios (Figura 3). Ao longo da fibra mielinizada, entre cada segmento axonal mielinizado existem regiões em que membrana plasmática do neurônio fica exposta à matriz extracelular, esses locais são denominados Nodos de Ranvier (BAUMANN & PHAM-DINH, 2001). Cada OLG pode fazer vários segmentos de bainha de mielina em diferentes axônios para promover a rápida condução saltatória através do agrupamento de canais de sódio dependentes de voltagem apenas nos Nodos de Ranvier (STADELMANN et al. 2019). A quantidade de bainhas de mielina feita por um OLG varia de acordo com a área do SNC (BAUMANN & PHAM-DINH, 2001). Essa organização faz com que a bainha de mielina promova a economia de energia por restringir a ocorrência de potenciais de ação em regiões de Nodos de Ranvier, o que reduz a necessidade de troca de Na^+ e K^+ pela bomba de Na^+/K^+ -ATPase, que é essencial para manter o potencial de repouso das membranas axonais (NAVE & WERNER, 2014). Por ser formada por membrana plasmática, a composição da mielina é 70% lipídica e 30% proteica. Fazem parte da composição majoritária de proteínas, a Proteína Básica de Mielina (MBP) e a Proteína Proteolipídica (PLP), somando 80% do total (BAUMANN & PHAM-DINH, 2001).

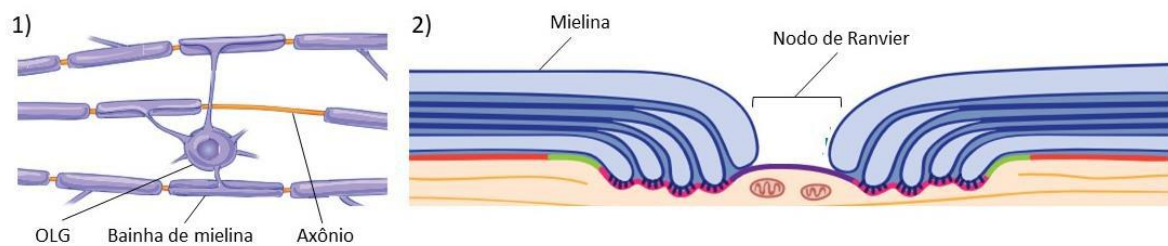


Figura 3: Figura representativa da mielinização no sistema nervoso central - Ilustração de um axônio mielinizado por oligodendrócitos (OLG) para formação da bainha de mielina (1), destacando a organização da mielina e o Nodo de Ranvier (2).

Fonte: Adaptada de SALZER & ZALC, 2016.

2.1.3 Estrutura, Função e Distribuição Celular do Neocórtex e Substância Branca

Ao final do desenvolvimento cortical, pode-se observar um córtex de seis camadas (isocórtex) organizado de maneira que a primeira camada fica em contato com a pia-máter e a última fica em contato com a substância branca subcortical (Figura 4 - 1), são elas: (I) camada molecular, possui poucas células, sendo elas neurônios pequenos com axônios organizados horizontalmente. Nesta camada os axônios se estendem paralelamente à superfície cortical, ou seja, de forma horizontal; (II) camada granular externa, composta por neurônios granulares e neurônios piramidais, cujos axônios descem para as camadas mais profundas e dendritos apicais ascendem para camada molecular. A camada em si, tem poucas fibras mielinizadas, mas possui axônios mielinizados de camadas mais profundas que ascendem; (III) camada piramidal externa, constituída por neurônios piramidais médios na parte inferior e na parte superior por neurônios pequenos. Os dendritos apicais ascendem para a camada I e os axônios são direcionados para as camadas mais internas; (IV) camada granular interna, formada por neurônios granulares, cujos prolongamentos se estendem para as outras camadas ou ramificam-se no local. Nesta camada também está presente uma banda horizontal mielinizada, denominada banda de Baillarger interna (Figura 4 - 2); (V) camada piramidal interna, constituída por neurônios piramidais médios, os quais emitem dendritos apicais para a camada II e III, e grandes, cujos dendritos vão para a camada I. Os axônios são direcionados para as camadas mais internas ou para a substância branca subcortical como fibras de projeção. Faz parte da camada V a banda de Baillarger externa (Figura 4 - 2); (VI) camada multiforme ou fusiforme, esta é composta por vários tipos neuronais, podendo ser piramidais, fusiformes e polimorfos. Os dendritos ascendem para camadas superiores e os axônios saem do córtex como projeções corticocorticais (MACHADO & HAERTEL, 2014; MARTINEZ et al. 2014; MIKI et al, 2015).

No geral, a banda de Baillarger é uma faixa horizontal mielinizada formada por fibras aferentes e aferências intracorticais. No córtex visual primário, a banda de Baillarger externa é formada por fibras aferentes do núcleo geniculado lateral e intracorticais (SCHOLTZ et al, 1981).

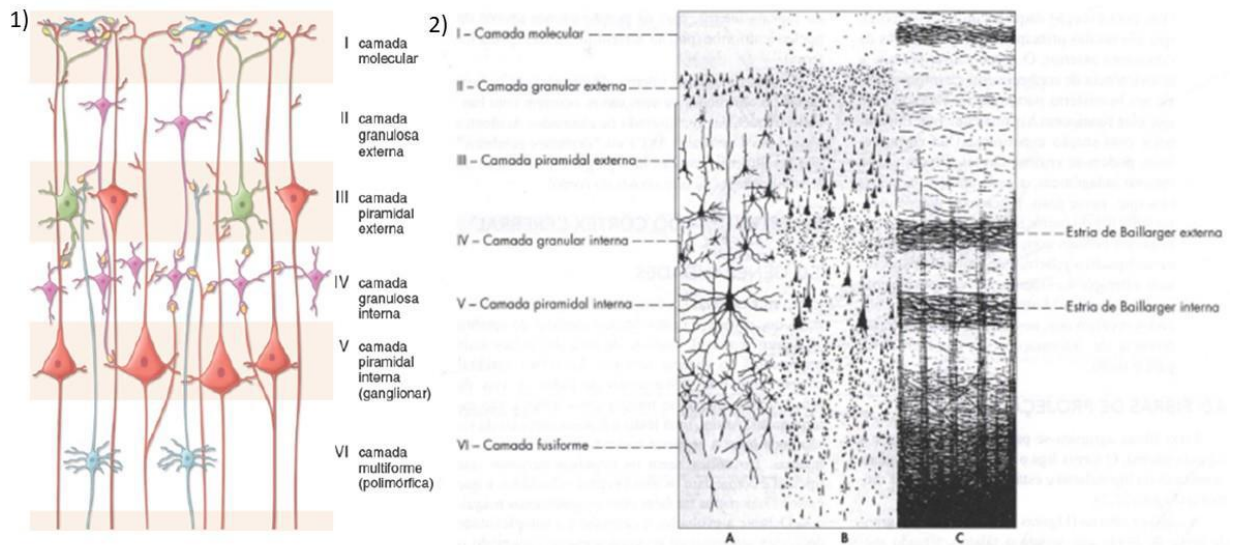


Figura 4: Imagem representativa das camadas corticais – (1) Ilustração da organização celular das seis camadas corticais. Os pontos amarelos representam os interneurônios; (2) Representação das camadas corticais vistas em diferentes preparações histológicas: (A) método de Golgi para prolongamentos neuronais; (B) método de Nissl para corpos neuronais; (C) método de Weigert para fibras mielínicas.

Fonte: Adaptada de MACHADO & HAERTEL, 2014; ROSS & PAWLINA, 2016.

Por possuir grande densidade de corpos celulares, o córtex cerebral possui aparência cinza a fresco, por isso também é chamado de Substância Cinzenta (SC). Em corte transversal a fresco, é possível identificar a diferença de coloração entre a parte externa (cinza) e a parte interna (branca). A coloração esbranquiçada da Substância Branca (SB) se dá devido à predominância da bainha de mielina dos axônios. O córtex cerebral recebe impulsos nervosos de todas as vias de sensibilidade, é nele que se tornam consciente e são interpretadas. Além disso, é responsável pelo aprendizado, memória, integração sensorial, processamento da informação e do pensamento e indução da resposta motora voluntária. Para realizar essas funções é necessário a associação de diferentes áreas do SNC, e essa comunicação ocorre através das fibras nervosas presentes na SB que integra todo o SNC (MACHADO & HAERTEL, 2014; MARTINEZ et al. 2014).

De acordo com a funcionalidade, as áreas corticais podem ser classificadas em áreas de projeção e áreas de associação. As de projeção estão diretamente relacionadas com a sensibilidade e motricidade, lesões nessas regiões podem causar parestesias e paralisias. Já as áreas associativas são relacionadas à integração de informações, lesões nessas áreas causam danos cognitivos e de aprendizagem. As áreas de projeção são divididas em áreas sensitivas e

áreas motoras, sendo compostas por isocórtex heterotípico do tipo granular (camada IV mais espessa com mais células granulares e camada V mais estreita), por exemplo, córtex somestésico primário e córtex auditivo primário ou agranular (camada IV menor, com poucas células granulares e camada V espessa), por exemplo, córtex motor primário. Por sua vez, as áreas de associação são compostas de isocórtex homotípico, cujas camadas são de espessuras semelhantes (MACHADO & HAERTEL, 2014; MARTINEZ et al. 2014).

Em concordância com a anatomia, o córtex pode ser dividido em sulcos, giros e lobos. Porém, esse tipo de divisão não respeita classificações funcionais e estruturais, já que um mesmo lobo pode ter áreas corticais com funções e estruturas diferentes (MACHADO & HAERTEL, 2014). A junção das regiões corticais temporo-parieto-occipital, localizada na fissura de Sylvius, possui intensa integração, intralobar e interlobar, por fibras de SB. Esse conjunto envolve funções superiores tais como linguagem, reconhecimento visuo-espacial, escrita, leitura, memória de trabalho, reconhecimento de pessoas e objetos, entre outras (DE BENEDICTIS et al. 2014).

A substância branca (SB) compreende 42% do volume neocortical (SB + SC) humano (SCHÜZ & MILLER, 2002, para revisão), sendo composta por fibras mielínicas que são classificadas em fibras de projeção, as quais ligam o córtex às regiões subcorticais e fibras de associação, que são divididas em fibras inter-hemisféricas e fibras intra-hemisféricas (MACHADO & HAERTEL, 2014). O corpo caloso é a maior comissura telencefálica e tem como função conectar os dois hemisférios, o que permite a transferência de informações e funcionamento harmônico do SNC (MACHADO & HAERTEL, 2014).

2.2 Plasticidade Cerebral

À capacidade adaptativa do SNC se dá o nome de plasticidade neural. Por meio dessa função, os neurônios possuem a habilidade de realizar alterações estruturais e funcionais em resposta a estímulos internos ou externos, por exemplo, aprendizagem e lesões. Após sofrer alguma injúria, as primeiras adaptações têm como objetivos principais: (1) limitar os danos iniciais para minimizar perda de função e (2) reorganizar o cérebro para restaurar e compensar funções já comprometidas ou perdidas (KLEIM & JONES, 2008). Os mecanismos para realização dessas alterações envolvem modificações nos tipos e na sincronia de sinapses, modulação glial, alterações fenotípicas, neurogênese e recrutamento de áreas que possuem funções semelhantes (DUFFAU, 2009).

Lesões encefálicas que envolvem perda de conexões desencadeiam em uma cascata de alterações, tais como limpeza dos debris em degeneração, produção de novas sinapses e remodelamento dos processos neuronais. Essa sinaptogênese reativa gerada pelas lesões pode provocar efeitos danosos a longo prazo, como alterações na excitabilidade cortical. De maneira independente, as lesões podem ocorrer tanto na fase adulta, quanto na infância, contudo, quando ocorrem durante o desenvolvimento podem gerar malformações corticais (KLEIM & JONES, 2008). Em regiões muito integradas, como a junção temporo-parieto-occipital, uma lesão em determinada área, no próprio neurônio ou no axônio, pode gerar tanto alterações locais quanto em uma região integrada distante. Porém, as modificações desencadeadas dependerão dos padrões de conectividade de cada área, já que as estruturas subcorticais não possuem os mesmos potenciais de plasticidade que as estruturas corticais (DUFFAU, 2009; DE BENEDICTIS et al. 2014).

2.6 Malformações do Espectro da Polimicrogiria

As Malformações do Espectro da Polimicrogiria (MEP) ocorrem no período pós-migracional e geralmente tem como causa infecções ou danos vasculares (BARKOVICH et al, 2012). A polimicrogiria (PMG) é classificada em forma laminada (Figura 5 B) e forma não laminada (Figura 5 C) e está relacionada à epilepsia e atraso global no desenvolvimento. No geral, macroscopicamente a PMG é caracterizada por vários pequenos giros. Entretanto, os dois tipos de PMG possuem características microscopicamente distintas, a forma laminada apresenta um neocórtex de 4 camadas, sem as camadas profundas, ao passo que a forma não laminada apresenta um neocórtex de 2 camadas (MCBRIDE E KEMPER, 1982; SILVA et al, 2021). Sua prevalência é desconhecida, uma vez que o diagnóstico por imagem requer ressonância magnética de alta definição, indisponível na rotina da maioria dos centros de saúde nacionais e internacionais. A Epilepsia é observada de 60 a 85% dos pacientes diagnosticados com PMG (LEVENTER et al, 2008), sendo a metade farmacorresistente (GUERRINI et al, 1997; FLOTATS-BASTARDAS et al, 2012). Adicionalmente, de 89 a 94% dos pacientes apresentam déficits intelectuais (FLOTATS-BASTARDAS et al, 2012; DE LA MOTA et al, 2011).

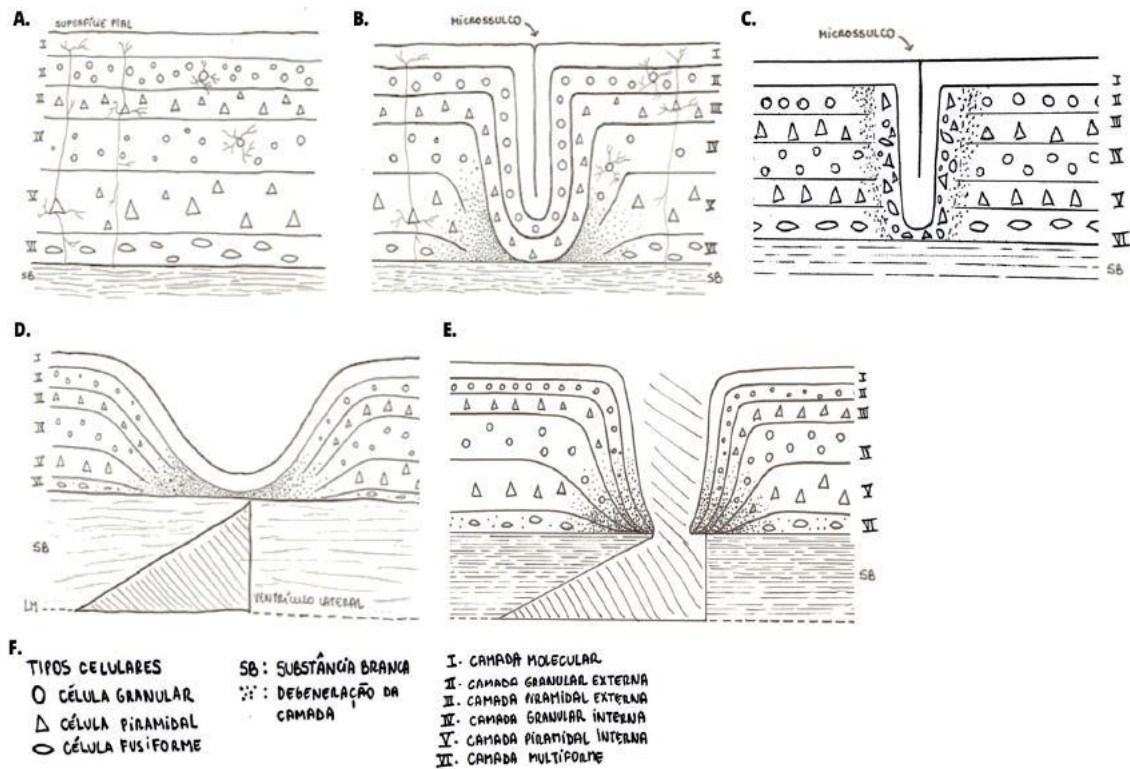


Figura 5: Esquemas das Malformações do Espectro da Polimicrogiria (MEP) - Imagens representativas do córtex normal (A) e das MEP (B – E). Detalhadamente, PMG laminada (B), PMG não-laminada (C), ESQ de lábios fechados (D) e ESQ de lábios abertos (E).

Fonte: SILVA et al, 2021.

A PMG pode ter diferentes causas e estar associada à outras malformações, entretanto, quando associada à Esquizencefalia (ESQ) geralmente tem como causa infecções ou danos vasculares (BARKOVICH et al, 2012). A ESQ faz parte das MEP, sendo a forma mais grave, com prevalência estimada de 1.48/100.000 nascidos (INAN et al. 2019). É uma desordem de natureza migracional ou pós-migracional caracterizada por formar uma fenda na substância cinzenta, cercada por córtex polimicrogírico (DENIS et al, 2000). Detalhadamente, existem dois tipos de ESQ, uma com lábios fechados (Figura 5 D e Figura 6 A) e outra com lábios abertos (Figura 5 E e Figura 6 B e C). O primeiro tipo possui as bordas da fenda contínuas e o segundo possui bordas fundidas, do ventrículo com a superfície pial, sendo preenchidas por líquido. No geral, a localização é variável, entretanto, a região perisilviana é frequentemente afetada, bem como na PMG (SILVA et al, 2021). Esta condição pode gerar danos motores, atraso global no desenvolvimento, epilepsia, entre outros. A severidade dos danos depende do local e da extensão da fenda. No geral, esta condição ocorre por problemas genéticos ou incidentes durante o desenvolvimento, ocorrendo entre o terceiro e o quarto mês de gestação

humana (DENIS et al, 2000). Adicionalmente, LOPES et al (2005) não encontrou diferença na severidade clínica e do EEG comparando os dois tipos de ESQ em pacientes com epilepsia (LOPES et al, 2005).

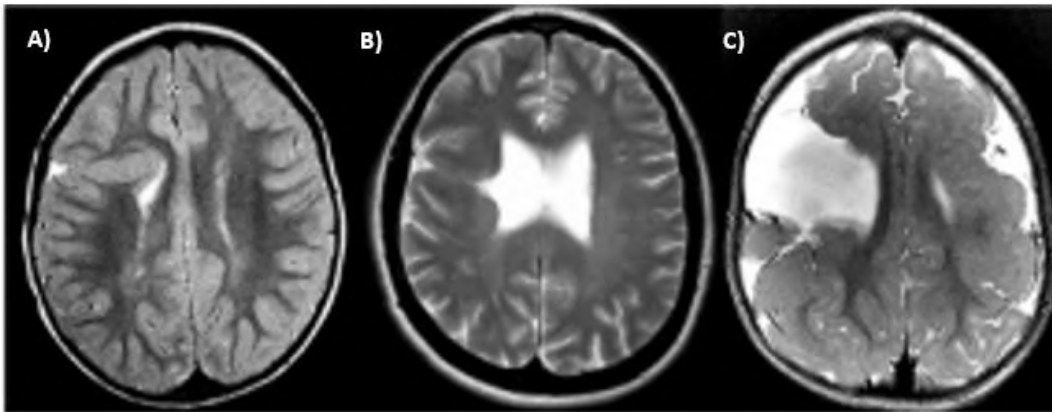


Figura 6: Imagem de Ressonância Magnética Representativa dos Tipos de Esquizencefalia. A) ESQ de lábios fechados; B e C) ESQ de lábios abertos

Fonte: Adaptada de GRIFFITHS 2018.

A falha de perfusão cortical gerada por danos vasculares entre a 20^a e a 24^a semana do desenvolvimento, provocam isquemia/hipóxia na região irrigada, levando ao aparecimento de uma MEP (MARQUES DIAS & HARMANT-VAN RIJCKEVORSEL, 1984). Contudo, a causa mais comum de MEP consiste na infecção intrauterina por citomegalovírus (CMV) (BARKOVICH, 1995). Uma vez infectado pelo CMV, o vírus permanece latente no organismo, podendo sofrer processo de reativação subsequente. Sua prevalência é alta, ficando entre 40% e 60% em países do hemisfério norte e situando-se entre 80% a 100% na África e América Latina. Estudos mostram que a prevalência no Brasil está em 81% no Rio de Janeiro, 90% em São Paulo e Santa Catarina e 87% em Salvador (MENDRONE JÚNIOR, 2010). Miura et al (2006) mostraram que 0,8% dos nascidos vivos em Porto Alegre se infectam com CMV durante a gestação, consistindo em fator de risco de grande importância para a ocorrência dessa malformação. Fatores genéticos são a segunda maior fonte de microgiria (MG), e a deleção do segmento 22q11.2 do cromossomo 22 é a mais prevalente (1 a cada 4000 nascidos vivos) (BIRD & SCAMBLER, 2000). Outras importantes deleções gênicas relacionadas ao surgimento da MG consistem na deleção dos genes responsáveis pela *filamina A*, *GPR56*, *XRPX2*, *tubulina A*, *tubulina B*, *CDG1Q*, *RAB3GAP*, *COL18A1*, *KIAA1279* e *OCLN* (FLOTATS-BARRADAS et al, 2012).

A PMG é conhecida como um espectro de desordens, com diferentes causas, variando de PMG leve com preservação da junção Substância Cinzenta (SC) – Substância Branca (SB) e SB normal, à PMG com múltiplas heterotopias e gliose na SB. Além disso, está relacionada ao atraso no desenvolvimento e epilepsia (SANTOS *et al*, 2014). A patogenia da PMG está relacionada à necrose das camadas pré-formadas. Após recuperação do suprimento sanguíneo, caso a camada proliferativa seja preservada, a migração de neuroblastos destinados à formação das camadas superficiais tem continuidade. Caso contrário, uma fenda se forma ao longo do córtex cerebral. Portanto, devido à morte das camadas profundas, o córtex caracteriza-se por uma depressão no ponto onde houve o déficit circulatório, formando o que se chama por microsulco ou fenda esquizecefálica e seu microgiro adjacente, a área paramicrogirial (MCBRIDE & KEMPER, 1982; JACOBS *et al.*, 1999a; 2000; MIKI *et al*, 2015). Nessa região podem ocorrer crescimento axonal e mielinização, levando à formação de uma banda mielinizada de orientação horizontal, como a SB subcortical (MIKI *et al*, 2015).

As MEP podem ser mimetizada em modelos animais pela lesão transcraniana por congelamento no dia pós natal (DPN) 1 em roedores (correspondente ao início do terceiro trimestre de gestação humana) (JACOBS *et al.*, 1999a; 2000). No modelo proposto por (DVOFÁK & FEIT, 1977), essa lesão induz lesão vascular, isquemia/hipóxia e morte dos neuroblastos diferenciados (camadas IV V e VIa). Com a recuperação da vasculatura, os neuroblastos a se diferenciarem subsequentemente migram, mas não ultrapassam a zona de necrose, formando um sulco aprofundado na placa cortical. Dessa forma, os neuroblastos relacionados às camadas superficiais formam 4 camadas abaixo de um sulco (1 contínua com a zona marginal; 2 contínua com as camadas II-III; 3 representada pela camada IV; e 4 representada pela preservada camada VIb). Uma vez que as camadas de VI a IVa estão ausentes na região do microsulco, aferências talâmicas e calosas terminam nas camadas apropriadas em regiões paramicrogirais, formando áreas de maior excitabilidade (JACOBS *et al*, 1999b; ROSEN *et al*, 2000). Caso lesões de maior duração sejam realizadas, é possível mimetizar a esquizecefalia (citar LUHMANN *et al*, 2016)

Embora modelos animais com MG apresentem atividade epileptiforme (BELL & JACOBS, 2014), convulsões tônico-clônicas generalizadas espontâneas não são observadas nesses animais. Entretanto, a presença da MG diminui o limiar para a indução de convulsão pela pilocarpina ou convulsão por hipertermia, levando a um quadro epilepsia (SCANTLEBURY *et al*, 2004; 2005).

Mecanicamente, foi revelado que interneurônios inibitórios de disparo rápido, Parvalbumina positivos, apresentam-se reduzidos na região paramicrogirial e com frequência de

disparo de potenciais de ação reduzida (ROSEN *et al*, 1998; GEORGE & JACOBS, 2011). Concomitantemente, interneurônios inibitórios de limiar baixo, Somatostatina positivos, apresentam aumento na frequência de disparo de potencial de ação (GEORGE & JACOBS, 2011), resultando em troca da eficaz inibição perissomática induzida por células parvalbumina positivas, por um aumento na inibição dendrítica menos eficiente derivada das células somatostatina positivas. Adicionalmente, receptores AMPA encontram-se em maior número na região paramicrogirial, enquanto os receptores GABA-A, reduzidos (JACOBS *et al*, 1999a; 2000). Esses achados sugerem que o equilíbrio excitação/inibição favoreça a excitação na região adjacente à lesão, gerando a hiperexcitabilidade necessária para o aparecimento de crises convulsivas. Essa hipótese foi confirmada pela análise da razão dos potenciais excitatórios e potenciais inibitórios pós-sinápticos (PEPS e PIPS), mostrando que na região paramicrogirial há um aumento na razão de PEPS sobre potenciais totais (JACOBS & PRINCE, 2005), favorecendo a hiperexcitabilidade. Complementarmente, demonstramos (MENDONÇA *et al*, 2013) que a lesão por congelamento, no córtex visual de ratos induz MG e o aparecimento de atividade epileptiforme a partir de P12.

Dados recentes têm mostrado a contribuição de células gliais, como os oligodendrócitos (OLG) no advento da hiperexcitabilidade (HANSON *et al*, 2016.). A lesão focal por congelamento induz migração de progenitores neurais que se diferenciam em neurônios e células gliais, com concomitante aumento da molécula inibitória derivada da mielina, Nogo-A e de seu receptor NGR (YU *et al*, 2016), sugerindo um papel para os OLGs e a mielinização no processo de hiperexcitabilidade encontrado nessa malformação. A bainha de mielina inibe a interação do campo elétrico de íons no meio extra- e intracelular, de forma que quanto mais espessa for, mais veloz é a propagação do impulso nervoso (SAMPAIO-BAPTISA & JOHANSEN-BERG, 2017). Ademais, foi mostrado que o processo de mielinização regula a organização dos segmentos excitáveis do axônio. Sendo assim, o espaçamento entre os nodos de Ranvier, altera a velocidade de propagação, modulando o fenômeno de somação temporal e espacial com as demais aferências de um neurônio pós-sináptico. Por fim, quanto maior e mais próximo do corpo celular estiver o segmento inicial do axônio, maior a probabilidade dos potenciais excitatórios pós sinápticos atingirem os canais de sódio dependentes de voltagem, em voltagem supra-limiar, aumentando a excitabilidade intrínseca (BUTTERMORE *et al*, 2013).

2.7 Convulsão Febril

Convulsões febris consistem em um evento convulsivante generalizado que pode ocorrer entre um mês e cinco anos após o nascimento, associada à doença febril, geralmente infecciosa, que não acomete o sistema nervoso central. Na maioria das vezes, são de curta duração e não afetam o desenvolvimento encefálico subsequente, sendo classificadas como convulsões febris simples. Quando são prolongadas, focais, recorrentes ou associadas a anormalidades neurológicas, classificam-se como complexas (CHUNG, 2014). No geral, convulsões ocorrem devido a alterações nas funções neurológicas causadas por uma excessiva descarga sincrônica dos neurônios encefálicos. Quando as convulsões ocorrem de maneira isolada, são consideradas eventos não epiléticos. Para ser classificada como uma convulsão epilética, é necessário a verificação de características clínicas que frequentemente ocorrem em conjunto com tipos de crise semelhantes, idade de início, achados de EEG, fatores desencadeantes, genética, história natural, prognóstico e resposta a drogas antiepiléticas (STAFSTROM & CARMANT, 2015).

Convulsões febris ocorrem de 2-9% das crianças até 5 anos de idade (DURANTE E CANCELIER, 2007), sendo o tipo mais comum de convulsões na infância. Sua incidência apresenta dois picos sazonais: um no inverno, quando infecções respiratórias têm alta incidência, e outro no verão, juntamente com a incidência aumentada de infecções gastrintestinais (STAFSTROM, 2002). Convulsões febris complexas ocorrem em 35% dos casos de convulsões febris notificadas em crianças, e apresentam-se clinicamente como convulsões generalizadas (BERG, et al 1996). Células do sistema imunológico atuantes no combate a infecções secretam citocinas (como a, interleucina-1beta), que atuam como pirógenos endógenos, ativando o centro de controle de temperatura no hipotálamo, aumentando o *set-point* da temperatura corporal (ENDRES et al, 1987). Interleucina-1beta aumenta a excitabilidade neuronal por mecanismos que envolvem tanto GABA quanto glutamato, levando a crises convulsivas (DUBÉ et al, 2005). Adicionalmente, a temperatura cerebral aumentada altera as propriedades de condução de canais iônicos sensíveis a temperatura (SHIBASAKI et al, 2007). Por fim, a hiperventilação induzida pela hipertermia leva a uma alcalose metabólica, aumentando a excitabilidade neuronal (SCHUCHMANN et al, 2006).

A longo prazo, convulsões febris podem levar a diversos comprometimentos, tais como redução desenvolvimento cognitivo, risco aumentado de desenvolver convulsões febris recorrentes e epilepsia, particularmente a epilepsia do lobo temporal (CHUNG et al, 2014). 3,2% dos pacientes com convulsões febris simples desenvolvem epilepsia, enquanto 9,9% dos

pacientes que apresentam crises complexas, desenvolvem a doença. Características das crises complexas que consistem em fatores de risco para o desenvolvimento da epilepsia incluem crises focais (8,1%), prolongadas (13,8%) e, principalmente malformação durante o desenvolvimento neural (33%) (BERG & SHINNAR, 1996).

Similarmente, a probabilidade de convulsionar pela injeção de pentilenotetrazol aumentou em ratos adultos que sofreram convulsões febris na infância (RAJAB et al, 2014). Em relação aos prejuízos cognitivos, convulsões febris prolongadas diminuíram o coeficiente de desenvolvimento de crianças de 100 para 93, além de diminuir sua retenção de memórias de 1 mês até um ano após o evento (SCOTT, 2014). Similarmente, convulsões febris prolongadas prejudicam o aprendizado espacial em ratos (RAJAB et al, 2014; OU-YANG et al, 2015; YAGOUBI et al, 2015).

Quando associada a microgiria, as convulsões febris levam a uma troca precoce dos transportadores de GABA no hipocampo, de forma que seus efeitos são inibitórios mais precocemente. Concomitantemente, os espinhos dendríticos em CA1 apresentam-se menores em tamanho e potenciais excitatórios em miniatura de amplitude reduzida, indicando sinapses excitatórias menos eficazes (AWAD et al, 2016). Adicionalmente, as aferências inibitórias em CA1 apresentam-se mais fortes em decorrência excitação mais forte sobre interneurônios inibitórios (OUARDOUSZ & CARMANT, 2012). Entretanto, correntes excitatórias pós sinápticas mediadas pelo receptor NMDA são potenciadas em CA1 (OUARDOUSZ et al, 2010). Dessa forma, uma ativação mais abrangente de CA3 resulta em uma entrada correlacionada, com menor amplitude em CA1, podendo gerar a sincronia necessária para a epileptogênese do lobo temporal. De fato, displasias neocorticais foram encontradas em 63% dos pacientes submetidos a lobotomia temporal devido à epilepsia refratária, sugerindo que a malformação cortical pode ser um fator de predisposição para o seu desenvolvimento (BOCTI et al, 2003).

Sendo assim, a investigação dos mecanismos através dos quais as malformações corticais levam à predisposição a convulsões febris na infância, e como ambos os fenômenos promovem a epileptogênese na idade adulta são cruciais para a identificação de alvos celulares e moleculares que podem se desdobrar em tratamentos ou estratégias preventivas para reduzir os danos que as malformações corticais e a epilepsia causam à nossa sociedade. Por fim, os aspectos relacionados à mielinização correspondem a alvos promissores que ainda não foram estudados adequadamente nessas patologias.

3 JUSTIFICATIVA

A ESQ é uma desordem de natureza migracional ou pós-migracional caracterizada por formar uma fenda na substância cinzenta, cercada por córtex polimicrogírico (DENIS et al, 2000). Detalhadamente, existem dois tipos de ESQ, uma com lábios fechados e outra com lábios abertos. O primeiro tipo possui as bordas da fenda contínuas e o segundo possui bordas fundidas, permitindo o contato do ventrículo com a superfície pial, sendo separadas apenas por líquido (Figura 2.6.1 D e 2.6.1 E) (SILVA et al, 2021). Esta condição pode gerar danos motores, atraso global no desenvolvimento, epilepsia, entre outros. A severidade dos danos depende do local e da extensão da fenda. No geral, esta condição ocorre por problemas genéticos ou incidentes durante o desenvolvimento, ocorrendo entre o terceiro e o quarto mês de gestação humana (DENIS et al, 2000). A ESQ faz parte das malformações do espectro da PMG (MEP), a qual é o tipo mais comum de malformação cortical displásica. Sua prevalência é desconhecida, uma vez que o diagnóstico por imagem requer ressonância magnética de alta definição, a qual encontra-se indisponível na rotina da maioria dos centros de saúde nacionais e internacionais. A Epilepsia é observada de 60 a 85% dos pacientes diagnosticados com PMG (LEVENTER et al, 2008), sendo a metade farmacorresistente (GUERRINE et al, 1997; FLOTATS-BASTARDAS et al, 2012). Adicionalmente, de 89 a 94% dos pacientes apresentam déficits intelectuais (FLOTATS-BASTARDAS et al, 2012; de la MOTA et al, 2011).

Acredita-se que a PMG de 4 camadas se desenvolva em decorrência a uma lesão isquêmica entre a 20^a e a 24^a semana do desenvolvimento embrionário, onde a hipoperfusão do primórdio cortical produz uma necrose focal nas camadas corticais pré-formadas, danificando a estrutura da glia radial, resultando na desorganização das camadas que se formam subsequentemente. Com a recuperação do suprimento sanguíneo, os novos neuroblastos a migrar ultrapassam a área de morte celular formando camadas acima desta. Devido à morte das camadas mais profundas, o córtex caracteriza-se por uma depressão no ponto onde houve o déficit circulatório, formando o que se chama por microsulco e seu microgiro adjacente (JACOBS et al., 1999a; 2000). Bem como a PMG, a ESQ se desenvolve em decorrência a danos vasculares, podendo ser causados por diversos fatores como infecções por CMV e ZIKV, hemorragia, isquemia e hipóxia (SILVA et al, 2021)

A causa externa mais comum das MEP consiste na infecção intrauterina por citomegalovírus (CMV) (BARKOVICH, 1995). Uma vez infectado pelo CMV, o vírus permanece latente no organismo, podendo sofrer processo de reativação subsequente. Sua prevalência é alta, ficando entre 40% e 60% em países do hemisfério norte e situando-se entre

80% a 100% na África e América Latina. Estudos mostram que a prevalência no Brasil esteve, nas últimas décadas em 81% no Rio de Janeiro, 90% em São Paulo e Santa Catarina e 87% em Salvador (MENDRONE JÚNIOR, 2010). Miura et al (2006) mostraram que 0,8% dos nascidos vivos em Porto Alegre se infectavam com CMV durante a gestação, consistindo em fator de risco de grande importância para a ocorrência dessas malformações. Fatores genéticos são a segunda maior fonte de MEP, e a deleção do segmento 22q11.2 do cromossomo 22 é a mais prevalente (1 a cada 4000 nascidos vivos) (BIRD & SCAMBLER, 2000). Outras importantes deleções gênicas relacionadas ao surgimento das MEP consistem na deleção dos genes responsáveis pela filamina A, GPR56, XRPX2, tubulina A, tubulina B, CDG1Q, RAB3GAP, COL18A1, KIAA1279 e OCLN (FLOTATS-BARRADAS et al, 2012). Especificamente alterações em GPR56 podem também afetar o desenvolvimento dos oligodendrócitos, consequentemente da mielina (GIERA *et al*, 2005).

Convulsões febris consistem em um evento convulsivante generalizado que pode ocorrer entre um mês e cinco anos após o nascimento, associada à doença febril, geralmente infecciosa, que não acomete o sistema nervoso central. Na maioria das vezes, são de curta duração e não afetam o desenvolvimento encefálico subsequente, sendo classificadas como convulsões febris simples. Quando são prolongadas, focais, recorrentes ou associadas a anormalidades neurológicas, classificam-se como complexas (CHUNG, 2014). Convulsões febris ocorrem de 2-9% das crianças até 5 anos de idade (DURANTE e CANCELIER, 2007), sendo o tipo mais comum de convulsões na infância (BERG, et al 1996). Sua incidência apresenta dois picos sazonais: um no inverno, quando infecções respiratórias têm alta incidência, e outro no verão, juntamente com a incidência aumentada de infecções gastrintestinais (STAFSTROM, 2002). Convulsões febris complexas ocorrem em 35% dos casos de convulsões febris notificadas em crianças, e apresentam-se clinicamente como convulsões generalizadas (BERG, et al 1996). Convulsões febris podem levar a diversos comprometimentos futuros, como redução do desenvolvimento cognitivo, risco aumentado de desenvolver convulsões febris recorrentes e epilepsia, particularmente a epilepsia do lobo temporal (CHUNG et al, 2014). Fatores de risco para o desenvolvimento da epilepsia consistem em crises focais (8.1%), prolongadas (13.8%) e, principalmente malformação durante o desenvolvimento neural (33%) (BERG & SHINNAR, 1996). Em relação aos prejuízos cognitivos, convulsões febris podem levar a diversos comprometimentos futuros, tais como redução desenvolvimento cognitivo, risco aumentado de desenvolver convulsões febris recorrentes e epilepsia, particularmente a epilepsia do lobo temporal (CHUNG et al, 2014). Cerca de 3.2% dos pacientes com convulsões febris simples desenvolvem epilepsia, enquanto

9.9% dos pacientes que apresentam crises complexas desenvolvem a doença. De fato, displasias neocorticais foram encontradas em 63% dos pacientes submetidos a lobotomia temporal devido à epilepsia refratária, sugerindo que a malformação cortical pode ser um fator de predisposição para o seu desenvolvimento (BOCTI et al, 2003).

Dessa forma, o estudo dos resultados plásticos das convulsões febris na infância, em especial quando associado a malformação cortical é de grande interesse científico e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, elaboração de estratégias de saúde pública e políticas educacionais no Brasil e no Mundo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

Este trabalho tem por objetivo geral estudar os efeitos das convulsões hipertérmicas na infância e da esquizencefalia na mielinização, correlacionando-a com a probabilidade de sofrer convulsões e sua gravidade na idade adulta.

4.2 Objetivos Específicos

1. Investigar a susceptibilidade dos animais lesionados sofrerem convulsões hipertérmicas na infância.
2. Testar a probabilidade e a severidade de convulsões na idade adulta, através da aplicação de doses convulsivantes ou letais de pentilenotetrazol.
3. Observar, histologicamente, o perfil de mielinização da região lesionada através da coloração da mielina por Luxol Fast Blue (LFB).
4. Comparar a mielinização do encéfalo dos grupos estudados através da marcação imunohistoquímica para oligodendrócitos maduros (anti-CC1) e mielina (anti-MBP).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram usados camundongos *Swiss* para a realização dos experimentos, os mesmos foram mantidos no biotério de roedores do Instituto Macaé de Ciência e Tecnologia – IMCT/UFRJ, com controle claro/escuro, sob ambiente ventilado e climatizado ao longo de todo o tempo de experimentação. As condições de alocação e procedimentos experimentais seguiram as especificações indicadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus UFRJ-Macaé (CEUA – Campus UFRJ-Macaé) sob certificado registrado com o n° MAC040.

5.2 Indução da Malformação

No DPN0 os camundongos foram anestesiados por injeção sistêmica de ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e o crânio foi exposto por incisão com lâmina de bisturi n° 10. Posteriormente, uma sonda de cobre (5 x 2 mm) resfriada à -55 °C com gelo seco, foi encostada sobre o crânio a 2 mm da linha média, anterior ao lambda por 5 segundos para indução da ESQ. A pele dos animais foi suturada e os mesmos foram devolvidos para as gaiolas.

5.3 Indução da Convulsão Hipertérmica

No DPN12 camundongos CT e ESQ foram expostos a ar seco à 47-48°C dentro de uma caixa para camundongos até o aparecimento de uma convulsão generalizada, quando foram retirados da caixa para recuperação. Para este procedimento, os animais receberam pré e pós-tratamento com soro 0,9% glicosado para evitar desidratação. A latência para o início da crise tônico-clônica generalizada foi quantificada.

5.4 Teste de Probabilidade e Gravidade de Convulsões

No DPN 100, um grupo de animais recebeu uma injeção intraperitoneal de PTZ em dose letal (80 mg/kg) para avaliação da gravidade da convulsão através da contagem do tempo que o animal levava para morrer após injeção de PTZ. O outro grupo de animais recebeu uma injeção intraperitoneal de PTZ em dose convulsiva (50 mg/kg) para verificação da latência de entrada em cada fase bem como a duração em cada fase. Para isso foi utilizada a escala de

Racine adaptada (VAN ERUM et al. 2019) e os animais foram gravados em uma arena de campo aberto por um período de 10 minutos após injeção de PTZ. A escala adaptada possui 8 fases, as quais são: 1 aprisionamento de olhar; 2 espasmos orofaciais; 3 arranco de pescoço; 4 convulsão clônica bilateral; 5 convulsão clônica unilateral; 6 convulsão tônica com manutenção postural; 7 convulsão tônica com perda postural; 8 convulsão tônico-clônica generalizada/salto selvagem. Ambas as doses foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) 34%.

5.5 Imunohistoquímica

No DPN 100, os camundongos foram anestesiados por injeção sistêmica de ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e mortos por perfusão por via intracárdica com fixador paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Os encéfalos foram dissecados e pós-fixados em PFA a 4% por imersão, durante 24 horas. Posteriormente, foram crioprotetidos em soluções de sacarose em concentrações crescentes de 20% e 30% (24 horas em cada). Por fim, os encéfalos foram congelados por imersão em gelo seco por 20 minutos e os cortes coronais à 14 µm foram feitos utilizando o criostato, sendo coletados em lâminas gelatinizadas.

O material foi utilizado para análise por imunoperoxidase da mielina, usando anticorpos contra MBP e para análise de oligodendrócitos utilizando anticorpos contra CC1 (tabela 1) com anticorpos secundários biotinizados (1:300) contra IgG de rato e camundongo, respectivamente. O procedimento inicial é a lavagem das lâminas em PBS e bloqueio dos sítios inespecíficos com uma solução de 0,3% triton X-100 e 10% soro de burro em PBS. Posteriormente, o material foi incubado com anticorpo primário diluído em solução de bloqueio por 24 horas. Após sucessivas lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário diluído em solução de bloqueio por 2 horas. Para amplificação do sinal, o material foi incubado com kit ABC da Vector Laboratories durante 30 minutos. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas em solução contendo 100 µL de DAB, 400 µL de PBS, 493 µL de água destilada e 7 µL de peróxido de hidrogênio. Por fim, o material foi desidratado em uma bateria de concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 95% e 100%), a deslipidação em xilol e montagem com Enthelan. As imagens foram obtidas com microscópio óptico acoplado a câmera fotográfica e processadas no Image J. As regiões analisadas foram: Substância Cinzenta (SC) adjacente à lesão (Figura 7 - 1), Substância Branca (SB) abaixo da lesão (Figura 7 - 2) e Corpo Caloso (CC) (Figura 7 - 3).

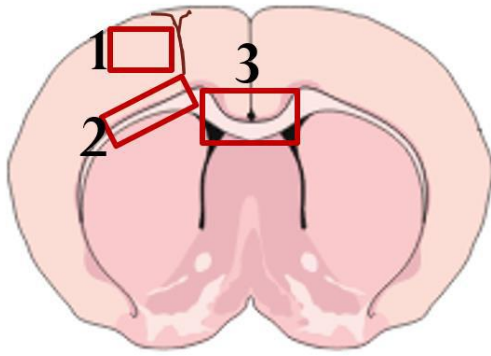


Figura 7: Esquema das regiões encefálicas analisadas. Imagem representativa indicando as regiões encefálicas analisadas em corte coronal: (1) substância cinzenta adjacente à lesão, (2) substância branca abaixo da lesão e (3) corpo caloso.

Anticorpo	Produzido em	Diluição	Fabricante
MBP (policlonal)	rato	1:200	Milipore
CC1 (monoclonal)	camundongo	1:200	Abcam

Tabela 1: Especificações dos anticorpos primários

5.6 Histologia por Luxol Fast Blue

As lâminas histológicas dos animais perfundidos com PFA 4% no DPN100 foram desidratadas em soluções de etanol até 95%, e subsequentemente incubadas com solução de Luxol Fast Blue (LFB) a 60°C por 24 horas. As lâminas foram rinçadas com etanol a 95% e hidratadas em concentrações decrescentes de álcool até 50%. Posteriormente, o material foi lavado em água e diferenciado em carbonato de lítio a 0,05%. Por fim, foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (50% a 100%), clarificado em xilol, e montado com entellan. As imagens foram obtidas com microscópio óptico acoplado a câmera fotográfica.

5.7 Análises Estatísticas

A análise dos resultados foi feita utilizando o GraphPad Prism 7.0, os quais foram representados pela média e desvio padrão. Os dados foram normalizados pelo controle e a comparação entre dois grupos foi feita usando o teste estatístico Test T não pareado com pós-teste de Tukey. Já as análises comparando mais de dois grupos foi feita usando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Suscetibilidade do animal com ESQ sofrer uma CH

Para avaliar a predisposição do animal com ESQ sofrer uma CH, foi contado o tempo desde o momento em que ele foi colocado na caixa, com temperatura controlada (47-48°C), até o animal sofrer uma convulsão tônico-clônica generalizada. Os dados mostram que a latência, em segundos, até o animal com ESQ (0,87) apresentar uma crise é menor que a do que o animal normal (1) ($p < 0,0001$) (Figura 8). A média absoluta da latência para convulsão dos animais lesionados é de 432,2 segundos e os animais controle em 496,3. Portanto, nossos resultados indicam que o animal com ESQ é mais susceptível a sofrer uma CH comparando com um animal normal (Figura 8).

Dado que foi mostrado a ocorrência de um aumento de receptores NMDA no córtex de animais com malformação induzida por congelamento (SHU et al, 2014), provavelmente os animais lesionados apresentam uma circuitaria mais propensa a hiperexcitabilidade, talvez por serem mais vulneráveis às alterações iônicas causadas pela alcalose metabólica, cujo mecanismo gerador da atividade epileptiforme é via aumento da atividade excitatória pelo receptor de NMDA (ARAM & LODGE, 1987).

Outro possível mecanismo é via Receptor Transitório Vanilóide tipo 1 (TRPV1), visto que foi observado um aumento significativo na expressão de TRPV1 no hipocampo e no córtex de roedores e de pacientes com epilepsia do lobo temporal (BHASKARAN & SMITH, 2010; SUN et al., 2013). O TRPV1 é um canal catiônico não seletivo controlado por ligantes ou por alta temperatura com grande permeabilidade para Ca^{+2} e é bastante presente no hipocampo. Por exercer uma importante função no equilíbrio entre excitação e inibição, o TRPV1 possui um papel importante na geração de crises convulsivas. Quando ativado, o TRPV1 gera uma inibição do influxo de cálcio e redução da liberação de GABA em preparações hipocampais sinaptossomais, gerando hiperexcitabilidade nas células piramidais invadidas. Porém, quando TRPV1 pré-sináptico é ativado, causa inibição de neurônios piramidais de CA1 por aumentar a liberação de GABA (JIA et al, 2015).

Além disso, foi medida a temperatura corporal do animal de forma oral, no momento inicial da crise tônico-clônica generalizada. Os dados apontam que o animal com ESQ (38,26 °C) atinge uma temperatura mais elevada do que o animal normal (37,74 °C) no início da convulsão (Figura 9). Isso ocorre, pois malformações congênitas podem causar uma deficiência no controle de temperatura (CROSS et al, 1971). Em conjunto, esses dados indicam que a ESQ

gera alterações encefálicas que predispõem o animal a sofrer convulsões quando estimulados por calor.

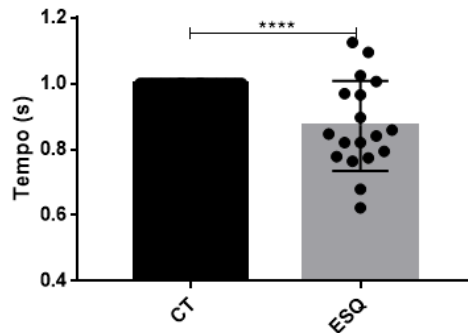


Figura 8: Tempo para o início da CH. Comparação das médias dos tempos (s) que os animais dos dois grupos levaram para sofrer uma CH. CT 1 ± 0 - n = 36; ESQ $0,87 \pm 0,032$ - n = 18; **** $p < 0.0001$. Os dados foram normalizados pelo controle e a diferença entre os grupos foi testada utilizando o teste T não pareado.

FONTE: PORTELA *et al*, 2018.

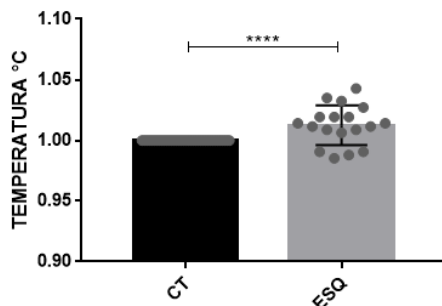


Figura 9: Temperatura corporal em que o animal sofre a CH. Comparação das médias das temperaturas (°C) que os animais dos dois grupos atingem ao sofrer uma CH. CT 1 ± 0 - n = 36; ESQ $1,012 \pm 0,0038$ - n = 18; **** $p < 0.0001$. Os dados foram normalizados pelo controle e a diferença entre os grupos foi testada utilizando o teste T não pareado.

FONTE: PORTELA *et al*, 2018.

6.2 Análise da severidade de convulsões por PTZ

A fim de investigar se a esquizencefalia e a convulsão hipertérmica na infância aumentam a gravidade de convulsões na idade adulta, foi contabilizado o tempo, em segundos, que o animal levou para morrer após convulsão provocada por injeção intraperitoneal de 80 mg/kg do antagonista do receptor de GABA-A (inibitório), PTZ, no DPN 100. Os dados mostram que a latência para a morte dos grupos CH (324.5 ± 88.91), ESQ (223.3 ± 43.47) e ESQ + CH (216.8 ± 40.04), é menor comparada ao grupo CT (564 ± 64.03). Isso indica que os animais lesionados

e/ou que sofreram CH, possuem maior probabilidade de sofrer convulsões mais graves que animais normais na fase adulta (Figura 10).

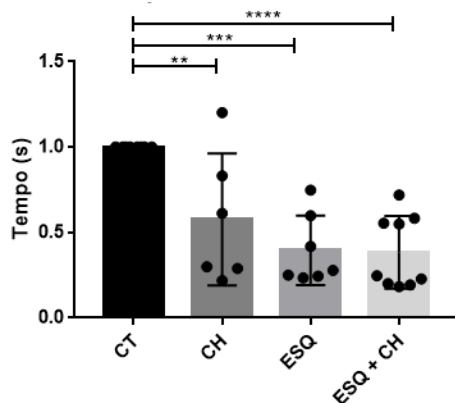


Figura 10: Latência para morrer após indução de convulsão. Comparação das médias dos tempos (s) que os animais dos quatro grupos levam para morrer após injeção de 80mg/kg de PTZ. CT – 1 ± 0 , n= 08; CH – $0,5754 \pm 0,3861$, n= 06; ESQ – $0,3959 \pm 0,2039$, n= 07; ESQ + CH – $0,3844 \pm 0,213$, n= 09; **** $p < 0.0001$, *** $p = 0.001$, ** $p = 0.01$. Os dados foram normalizados pelo controle e a diferença entre os grupos foi testada utilizando o teste one-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.

FONTE: PORTELA *et al*, 2020.

A severidade das convulsões também pode ser medida utilizando a escala de Racine modificada, a qual avalia o comportamento do animal durante uma crise convulsiva separando-os em fases de acordo com a gravidade, sendo a fase 1 mais branda e a fase 8 mais severa (Figura 11) (VAN ERUM *et al*, 2019). No DPN 100 foi contabilizado o tempo que o animal levou para entrar em cada fase da escala de Racine adaptada (Figura 12) e também o tempo que o animal permaneceu em cada fase (Figura 13). A análise da latência para a entrada em cada fase revelou que os animais dos grupos CH e ESQ + CH demoraram mais para entrar na fase 1 (aprisionamento do olhar) em comparação aos animais do grupo CT. Entretanto, os grupos ESQ, CH e ESQ + CH tiveram menor latência para apresentar a fase 6 (crise tônica com manutenção postural) que os animais do grupo CT (Figura 12). Em relação à duração de cada fase convulsiva, foi observado que os animais dos grupos CH e ESQ + CH permaneceram mais tempo na fase 6, quando comparados aos animais dos grupos CT e ESQ. De forma interessante, os animais do grupo ESQ apresentaram maior tempo na fase 1 (Figura 13).

Ainda que a análise tenha sido apenas comportamental, é possível observar os efeitos a longo prazo causados pela ESQ. Além da maior propensão à convulsão por hipertemia na infância, os animais com ESQ morrem mais rápido quando administrado uma dose letal de PTZ e também atingem convulsões mais severas em menor latência do que animais normais. Em concordância com RAJAB *et al* (2014), os quais mostram que os animais que sofreram

convulsão febril na infância possuem maior probabilidade de convulsionar quando estimulados com PTZ (RAJAB et al, 2014). A CH isolada ou em conjunto com a ESQ também é um fator importante para o agravamento epileptogênese, tanto quando a latência para morte, quanto quando o tempo para início e duração em lesões severas são avaliados. Esses animais ficaram mais tempo em convulsão tônica com manutenção postural, que é muito severa e aparece no eletroencefalograma (EEG) como descargas poli-spike de alta amplitude (VAN ERUM et al, 2019). De forma interessante, a totalidade dos animais avaliados em nosso estudo após uma dose letal de PTZ morrem durante essa fase da escala de Racine.

Em um modelo semelhante de lesão induzida por congelamento e convulsão hipertérmica, OUADOUZ et al (2010) mostraram que em dez dias após a indução de hipertemia já se observa uma hiperexcitabilidade mediada por receptores NMDA e AMPA em células piramidais de CA1 hipocampal (OUADOUZ et al, 2010). Além disso, GIBBS et al (2008) identificaram alterações na atividade inibitória via GABA-A e GABA-B, cuja alteração foi um aumento na amplitude do potencial inibitório pós-sináptico (GIBBS et al, 2008). A longo prazo, os efeitos são aparecimento de convulsões recorrentes espontâneas, devido ao surgimento de alta atividade rítmica no hipocampo de animais adultos, observadas através do EEG e prejuízos na memória visuoespacial verificado pelo teste do labirinto aquático de Morris (SCANTLEBURY et al, 2005). Além disso, há alterações estruturais, como redução do volume hipocampal ipsilateral à lesão, devido à diminuição de neurônios hipocampais e também à redução na densidade de espinhas dendríticas de neurônios piramidais. Foi também observado, por western blot, um aumento de receptores NMDA no hipocampo (GIBBS et al, 2011).

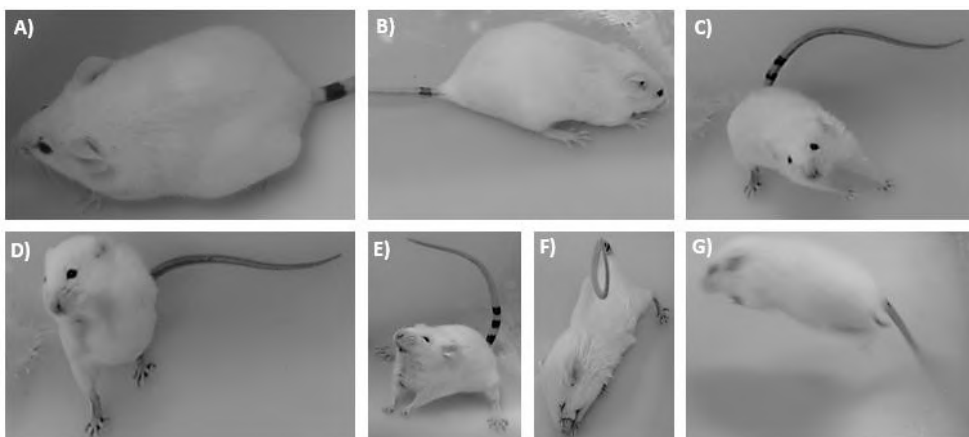


Figura 11: Fases da Escala de Racine modificada. A) Fase 1 – Aprisionamento no olhar; B) Fase 3 – Arranco de pescoço; C) Fase 4 – Convulsão clônica unilateral; D) Fase 5 – Convulsão clônica bilateral; E) Fase 6 – Convulsão tônica com manutenção postural; F) Fase 7 – Convulsão tônica com perda postural; G) Fase 8 – Convulsão tônico-clônica generalizada/salto selvagem.

FONTE: PIRES, et al dado não publicado

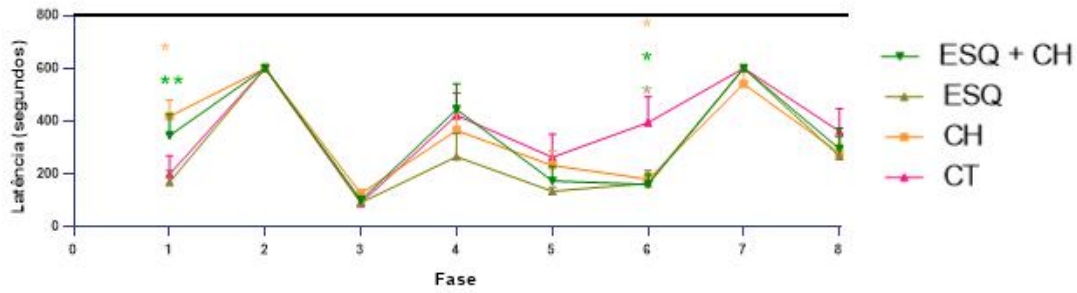


Figura 12: Latência para convulsão após injeção de 50 mg/kg de PTZ. A figura mostra a latência para entrada nas fases convulsivas da escala de Racine adaptada: 1: Aprisionamento de olhar; 2: espasmos orofaciais; 3: arranco de pescoço; 4: convulsão clônica unilateral sentado; 5: convulsões clônicas bilaterais; 6: convulsão tônica com manutenção postural; 7: convulsão tônica com perda postural; 8: convulsão tônico-clônica generalizada/salto selvagem $**p < 0.01$, $*p < 0.05$. A diferença entre os grupos foi testada utilizando o teste two-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.

FONTE: PORTELA et al, 2022.

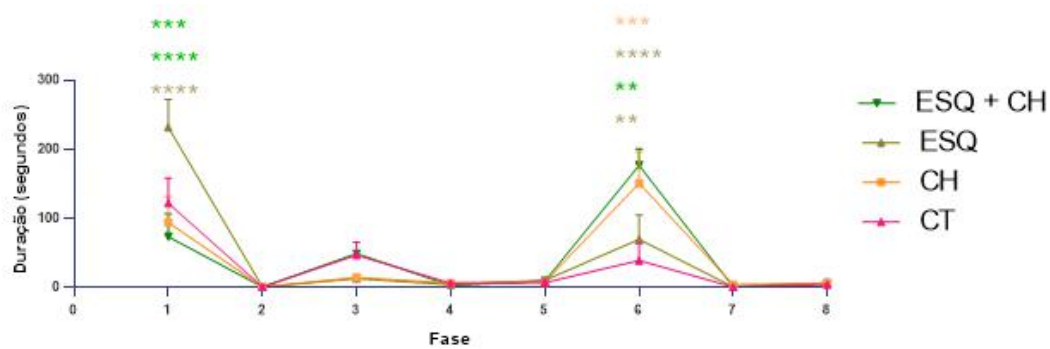


Figura 13: Duração das crises após injeção de 50 mg/kg de PTZ. A figura mostra a duração de permanência nas fases convulsivas da escala de Racine adaptada. 1: Aprisionamento de olhar; 2: espasmos orofaciais; 3: arranco de pescoço; 4: convulsão clônica unilateral sentado; 5: convulsões clônicas bilaterais; 6: convulsão tônica com manutenção postural; 7: convulsão tônica com perda postural; 8: convulsão tônico-clônica generalizada/salto selvagem $****p < 0.0001$, $***p < 0.001$, $**p < 0.01$. A diferença entre os grupos foi testada utilizando o teste two-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.

FONTE: PORTELA et al, 2020.

6.3 Aspecto da mielinização na região lesionada por coloração com Luxol Fast Blue (LFB)

A ESQ é uma malformação migracional ou pós-migracional definida como fissuras corticais com polimicrogiria no córtex adjacente (BARKOVICH *et al*, 2012). As fissuras vão desde o revestimento ependimal dos ventrículos laterais até a cobertura pial (YAKOVLEV & WADSWORTH, 1946). A linha vermelha da figura 14 c representa a fissura presente em fatias de encéfalo de camundongos com ESQ em DPN100, coradas com LFB. Abaixo da ESQ observa-se uma SB subcortical desorganizada formando uma protuberância anormal. Possivelmente é uma irregularidade da junção SC – SB, que também é observada em imagens de Ressonância Magnética ponderadas em T2 de pacientes com MEP (TAKANASHI & BARKOVICH, 2003).

Nesse estudo, foram observados dois padrões de lesão em Imagens de Ressonância Magnética (IRM) ponderada em T2 em pacientes com MEP. O padrão 1 (um) possui córtex pequeno, fino e ondulado (3-4 mm), já o padrão 2 (dois) apresenta córtex protuberante (6-8 mm) e junção SC – SB irregular. Esses padrões também se diferenciam na maturidade do córtex e da SB subcortical. O padrão 1 é observado em bebês e o padrão 2 em crianças. Adicionalmente, a imagem de um mesmo indivíduo pode apresentar os dois padrões, sendo padrão 1 em regiões que desenvolvem SB subcortical tardiamente e padrão 2 nas que desenvolvem mais precocemente. Uma das explicações para essa mudança vista na MEP é que a mielinização das fibras subcorticalis ou intracorticalis, indicada pela diminuição de sinal nas IRM ponderadas em T2, possa alterar a aparência cortical nessas regiões (TAKANASHI & BARKOVICH, 2003).

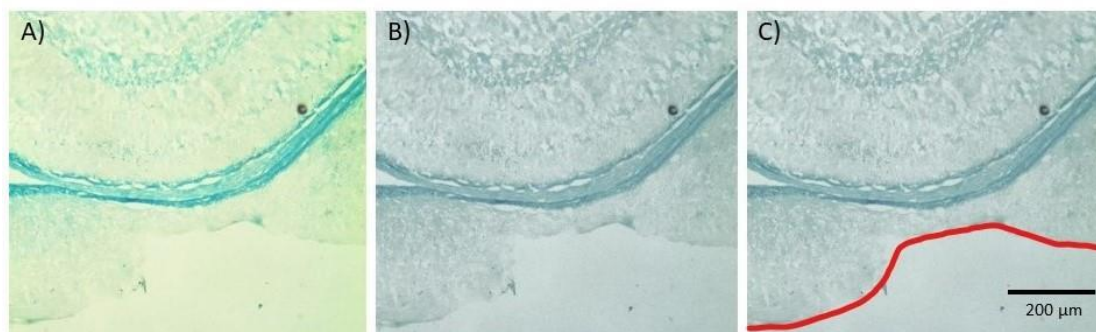


Figura 14: Aspecto da mielinização na região da ESQ. A) milinização observada por coloração com LFB; B) imagem em escala de preto e branco para melhor visualização da ESQ; C) a linha vermelha representa a borda do córtex com ESQ.

FORTE: PORTELA *et al*, 2020.

6.4 Avaliação da mielinização por IHQ

6.4.1 Intensidade de mielinização e número de OLGs na SC adjacente à lesão

As camadas infragranulares do córtex não lesionado, normalmente possuem OLGs (Figuras 15a e 15b) e fibras mielinizadas (Figuras 16a e 16b), contudo nossos dados sugerem que quando se trata de um córtex com ESQ, as camadas mais profundas da região paramicrogiral possuem uma maior quantidade de OLGs (Figura 15c e 15d) e de fibras mielinizadas (Figuras 16c e 16d). A quantificação do número de OLGs marcados para CC1 indica que animais lesionados que sofreram CH (ESQ + CH), possuem maior número de OLGs do que animais CT e CH ($p=0,0057$; $p=0,0386$, respectivamente) e que animais apenas lesionados (ESQ) possuem maior quantidade de OLG do que animais CT ($p=0,0120$). Ademais, a análise do valor de intensidade de marcação para MBP mostra que animais lesionados que sofreram CH (ESQ + CH) ou não (ESQ), possuem maior intensidade de MBP marcado do que animais sem lesão CT ($p<0,0001$; $p<0,0001$, respectivamente) e CH ($p=0,0031$; $p=0,9578$, respectivamente). Dessa forma, os resultados demonstram que o córtex lesionado desenvolve um aumento da quantidade de OLGs (Figura 15e) e de mielinização intracortical (Figura 16e) em animais adultos. Similarmente, estudo pós-mortem de um paciente de 65 anos revelou em imagens imunohistoquímicas do córtex cerebral com MEP, que a SB intracortical desenvolveu-se nas camadas mais profundas do córtex, sendo proveniente da SB subcortical devido à característica imunorreatividade para astrócitos. Em pacientes controles a SB intracortical é chamada de banda de Baillarger, e localiza-se na camada IV, não possuindo imunorreatividade para astrócitos, como a SB subcortical (MIKI *et al*, 2015). Essa extensão da substância branca em direção às camadas profundas do córtex podem aumentar a velocidade de condução das informações, contribuindo para a hiperexcitabilidade.

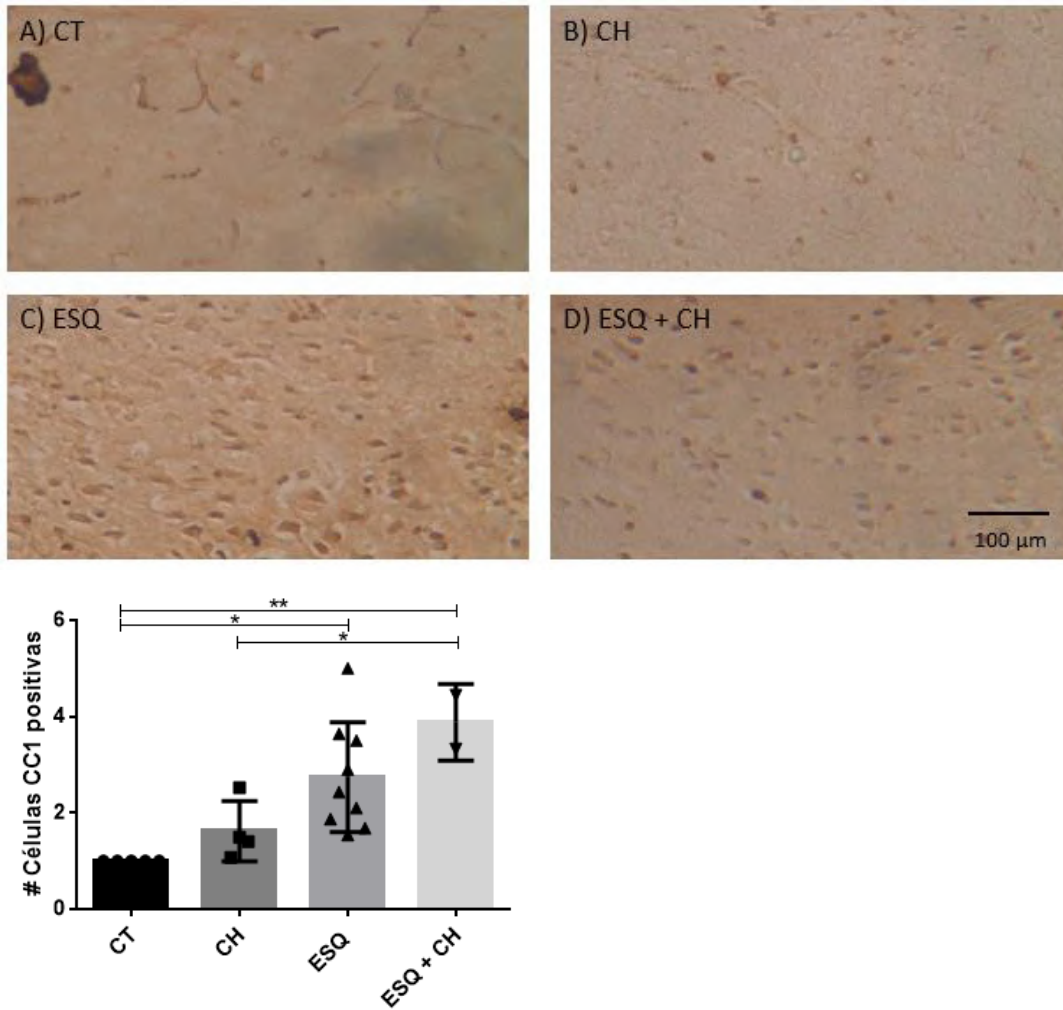


Figura 15: Quantidade de OLGs na SC adjacente à lesão. Fotomicrografia representativa dos OLGs na SC observado por marcação com anti-CC1 dos grupos CT (A), CH (B), ESQ (C) e ESQ + CH (D). E, Comparação, entre os grupos, das médias dos números de OLGs marcados com CC1 na SC paramicrogiral. CT – 1 ± 0 , n= 05; CH – $1,62 \pm 0,6266$, n= 04; ESQ – $2,74 \pm 1,137$, n= 09; ESQ + CH – $3,88 \pm 0,792$, n= 02; * $p < 0.05$, ** $p < 0,001$. Os dados foram normalizados pelo controle e a diferença entre os grupos foi testada utilizando o teste one-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.
FONTE: PORTELA *et al*, 2018.

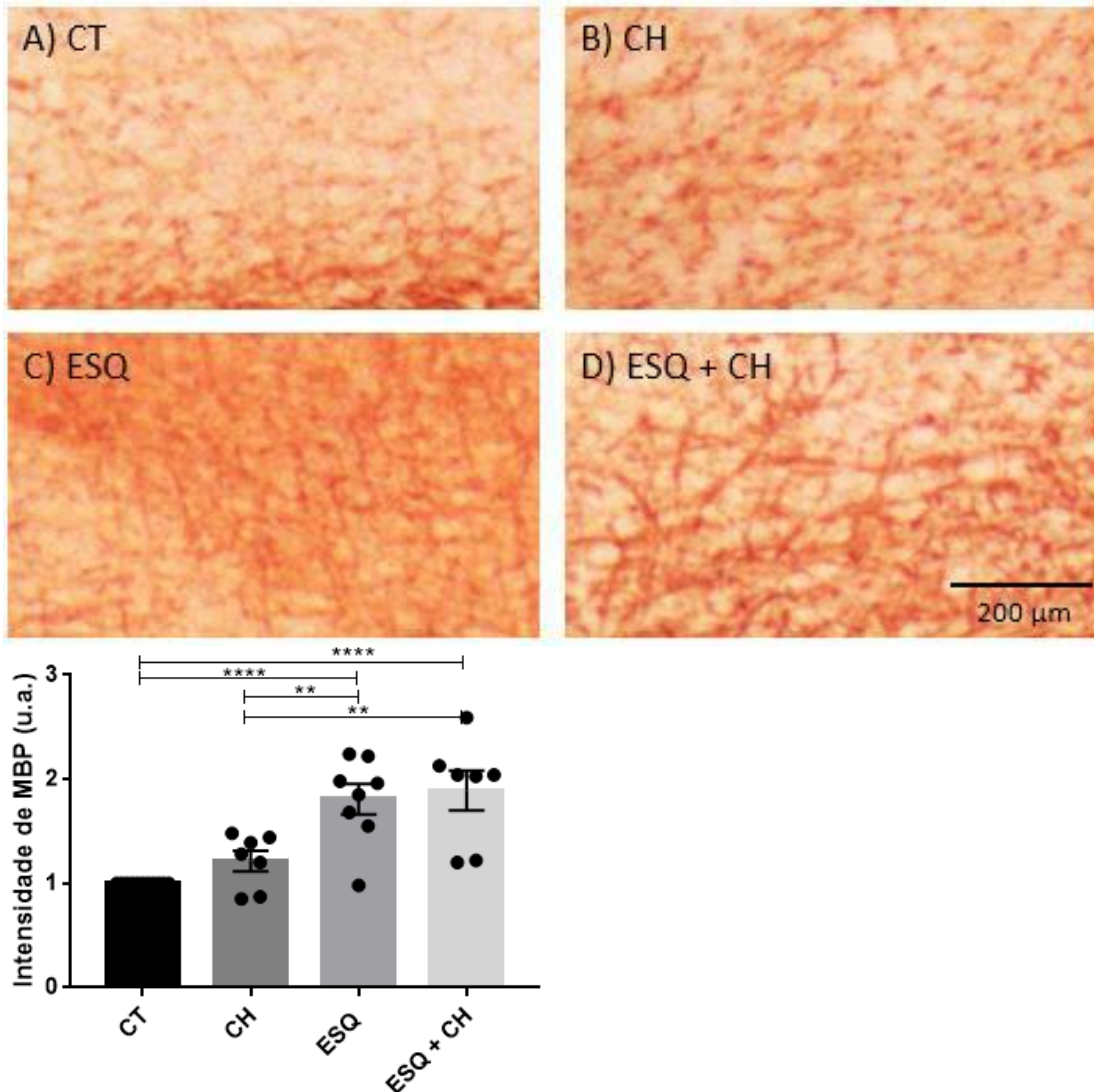


Figura 16: Mielinização na SC adjacente à lesão. Fotomicrografia representativa da mielina observada por marcação com anti-MBP na SC dos grupos CT (A), CH (B), ESQ (C) e ESQ + CH (D). E, Comparação, entre os grupos, das médias dos valores de intensidade de marcação de MBP na SC paramicrogirial. CT – 1 ± 0 , n= 11; CH – $1,216 \pm 0,2608$, n= 07; ESQ – $1,808 \pm 0,4105$, n= 08, ESQ + CH – $1,893 \pm 0,5062$, n= 07; **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$. Os dados foram normalizados pelo controle e a diferença entre os grupos foi testada utilizando o teste one-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey. FONTE: PORTELA *et al*, 2018.

6.4.2 Intensidade de mielinização e número de OLGs na SB abaixo da lesão

A SB subcortical é composta por fibras nervosas miélicas e amielínicas, as quais formam feixes que podem ser classificados como projeções, setores associativos ou comissuras (ENGELHARDT *et al*, 2009; SANTOS *et al*, 2014). Essas estruturas constroem as conexões neurais de regiões corticais entre si ou com estruturas subcorticais e constituem a base de redes neurais para integração motora, sensorial, cognitiva e comportamental (XIE *et al*, 2016). Nossos

resultados mostram que os animais lesionados, que sofreram CH (ESQ + CH) ou não (ESQ) e animais que sofreram apenas CH (Figuras 17b, 17c e 17d) possuem maior quantidade de OLGs do que animais CT (Figura 17a) ($p=0,0145$; $p=0,0184$; $p=0,00051$, respectivamente) na SB abaixo da lesão. Além disso, a análise do valor de intensidade de marcação para MBP mostra que animais lesionados que sofreram CH (ESQ + CH) ou não (ESQ) e animais CH (18b, 18c e 18d), possuem maior intensidade de MBP marcado do que animais sem lesão CT (Figuras 18a) ($p=0,0009$; $p=0,0067$; $p=0,0002$, respectivamente). Dessa forma, há um aumento de OLG (Figura 17e) e mielinização (Figura 18e) na SB abaixo da lesão de animais experimentais.

Em contraponto aos nossos resultados, imagens de ressonância magnética de pacientes entre um e dois anos, com MEP apresentam aumento na intensidade do sinal na SB, que significa hipomielinização, mas sem alteração de volume. Além disso, imagens histopatológicas mostram diferentes graus de comprometimento da substância branca, incluindo hipomielinização, desmielinização e gliose (SANTOS *et al*, 2014). É possível supor que inicialmente a lesão gere prejuízos na mielinização e, devido a intensa atividade neuronal consequente da plasticidade sináptica que acontece no local (JACOBS *et al*, 1999a) ocorra o aumento da mielinização, podendo gerar hipermielinização na fase adulta, como observado nos animais com ESQ do presente estudo. Isso é possível, pois os OLGs respondem à atividade neuronal, por meio dos receptores de neurotransmissores e canais iônicos presentes em suas membranas. Exemplificando, os OLGs podem exercer suporte metabólico aos neurônios via receptores NMDA devido à liberação glutamatérgica axonal (SUMINAITE *et al*, 2019).

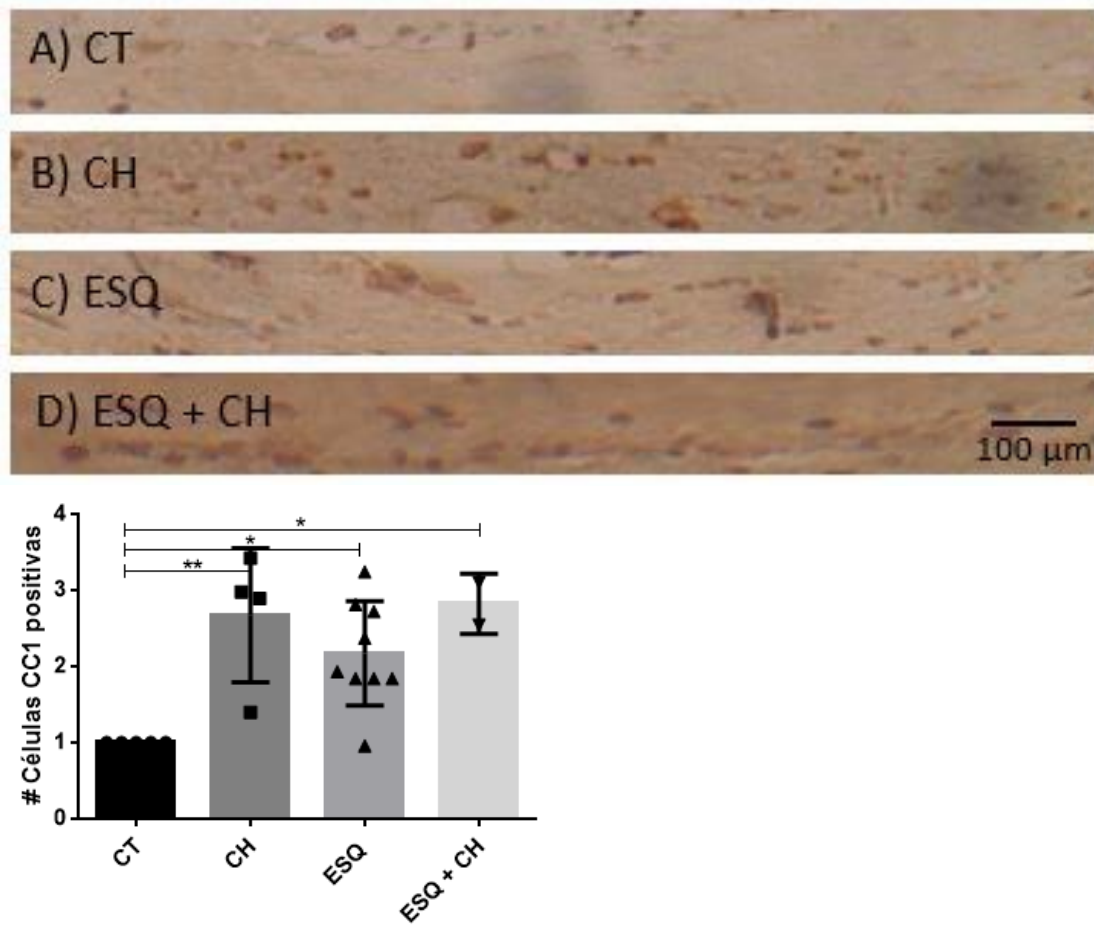


Figura 17: Quantidade de OLGs na SB abaixo da lesão. Fotomicrografia representativa dos OLGs na SB observado por marcação com anti-CC1 dos grupos CT (A), CH (B), ESQ (C) e ESQ + CH (D). E, Comparação, entre os grupos, das médias dos números de OLGs marcados com CC1 na SB abaixo do microgiro. CT – 1 ± 0 , n= 05; CH – $2,673 \pm 0,8794$, n= 04; ESQ – $2,172 \pm 0,6842$, n= 09; ESQ + CH – $2,82 \pm 0,396$, n= 02; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Os dados foram normalizados pelo controle e a diferença entre os grupos foi testada utilizando o teste one-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.
FONTE: PORTELA *et al*, 2018.

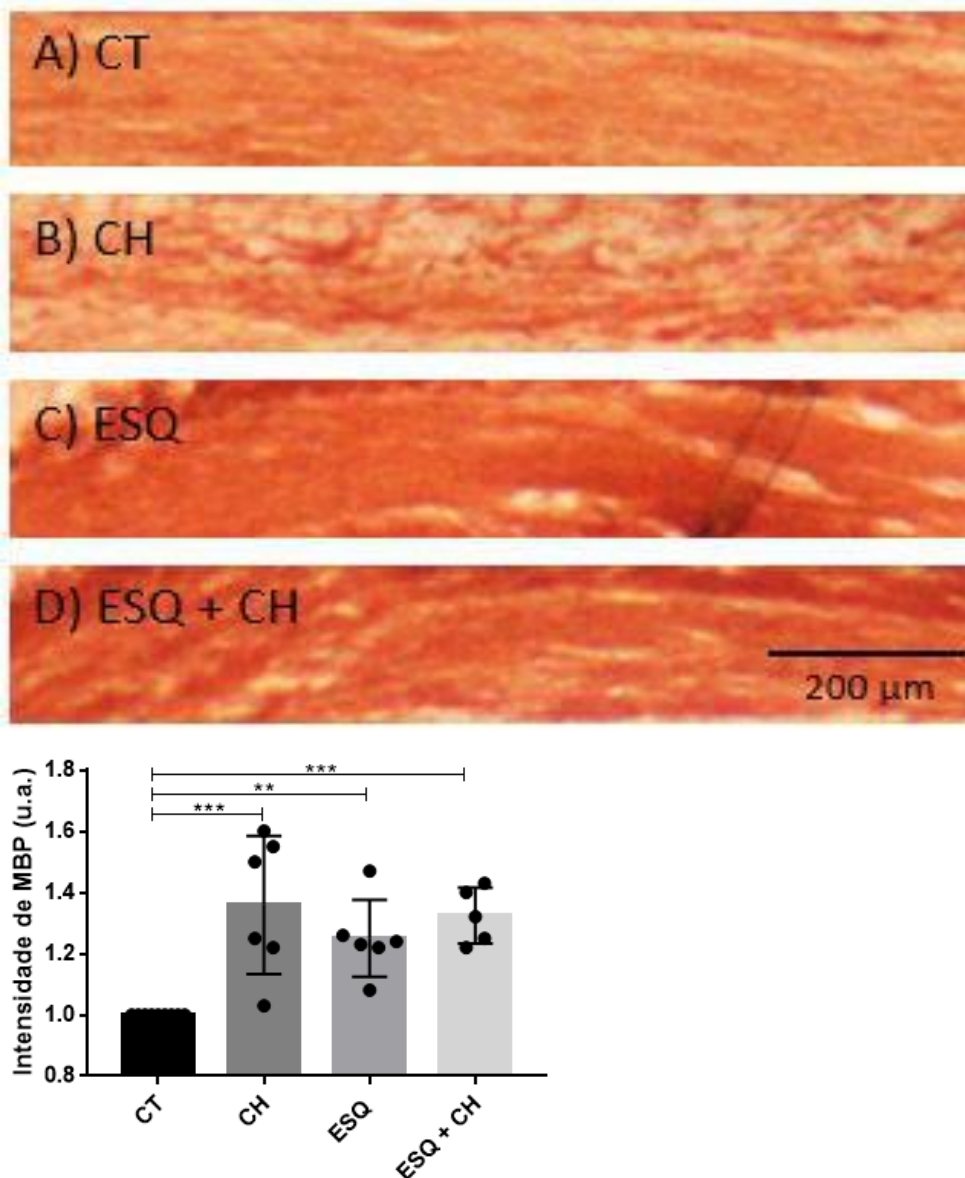


Figura 18: Mielinização na SB abaixo da lesão. Fotomicrografia representativa da mielina observada por marcação com anti-MBP na SB dos grupos CT (A), CH (B), ESQ (C) e ESQ + CH (D). E, Comparação, entre os grupos, das médias dos valores de intensidade de marcação de MBP na SB abaixo do microgiro. CT – 1 ± 0 , n= 11; CH – $1,358 \pm 0,2253$, n= 08; ESQ – $1,25 \pm 0,1255$, n= 08; ESQ + CH – $1,324 \pm 0,04082$, n= 07. Os dados foram normalizados pelo controle e a diferença entre os grupos foi testada utilizando o teste one-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.
 FONTE: PORTELA *et al*, 2018.

6.4.3 Intensidade de mielinização e número de OLGs no CC

O CC é classificado como fibra comissural e desempenha a função de conectar os dois hemisférios cerebrais. Possui um papel importante na transmissão de sinais entre os hemisférios esquerdo e direito, em sua composição estão presentes fibras de origem cortical

(ENGELHARDT *et al*, 2009; TANAKA-ARAKAWA *et al*, 2015). Nossos dados mostram que os animais lesionados (ESQ) (Figura 19b) possuem maior quantidade de OLGs do que animais normais (CT – $p=0,0117$) (Figura 19a) no CC. Além disso, a análise do valor de intensidade de marcação para MBP mostra que animais lesionados, que sofreram CH (ESQ + CH) ou não (ESQ) (Figura 20b e 20c), possuem maior intensidade de MBP marcado do que animais CT ($p=0,0187$; $p=0,0407$, respectivamente) e CH ($p=0,0070$; $p=0,0107$, respectivamente) (Figura 20a). Portanto, observa-se um aumento de OLG no CC de animais lesionados (Figura 19d) e é provável que eles estejam mielinizando (Figura 20d).

Estudos de THRELKELD *et al* (2007) observaram, em DPN90, que a lesão por congelamento bilateral em ratos causa a diminuição do volume do CC quando realizadas em P1 e P3, tendo perda de 22% e 11% de volume do CC, respectivamente (THRELKELD *et al*, 2007). A partir disso, é importante a investigação do volume do CC atrelado ao aumento de mielina observado nos animais com MEP, visto que 60% da composição do CC é mielina (STURROCK, 1980).

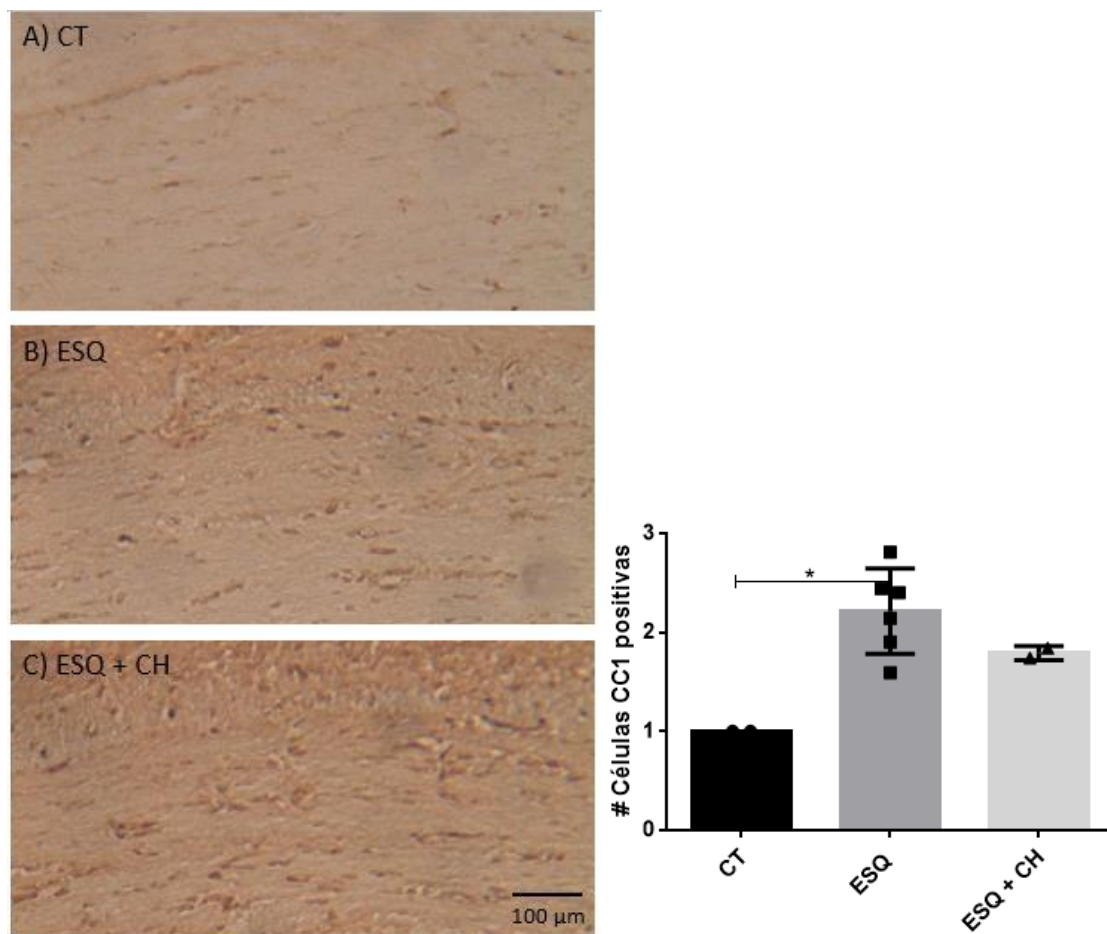


Figura 19: Quantidade de OLGs no CC. Fotomicrografia representativa dos OLGs no CC observado por marcação com anti-CC1 dos grupos CT (A), CH (B), ESQ (C) e ESQ + CH (D).

E, Comparação, entre os grupos, das médias dos números de OLGs marcados com CC1 no CC. CT – 1 ± 0 , n= 02; ESQ – $2,213 \pm 0,4323$, n= 06; ESQ + CH – $1,79 \pm 0,07071$, n= 02; * $p < 0.05$. Os dados foram normalizados pelo controle e a diferença entre os grupos foi testada utilizando o teste one-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.
 FONTE: PORTELA *et al*, 2018.

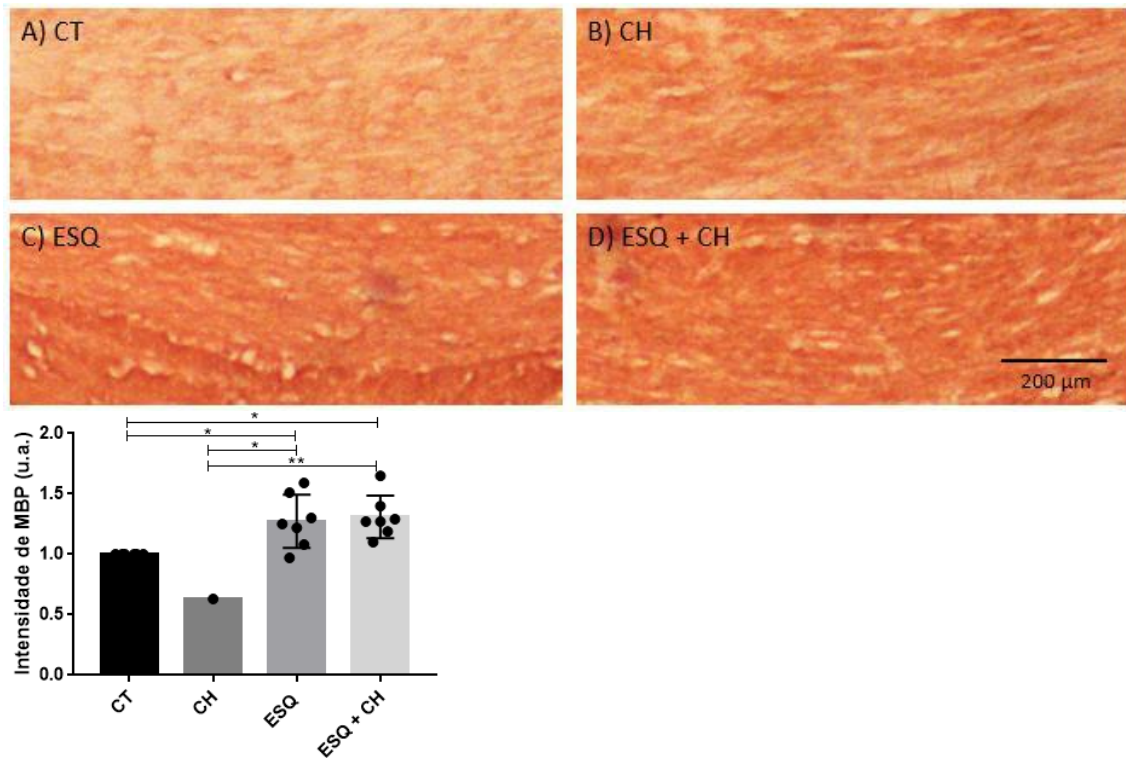


Figura 20: Mielinização no CC. Fotomicrografia representativa da mielina observada por marcação com anti-MBP no CC dos grupos CT (A), CH (B), ESQ (C) e ESQ + CH (D). **E**, Comparação, entre os grupos, das médias dos valores de intensidade de marcação de MBP no CC. CT – 1 ± 0 , n= 04; CH – $0,63 \pm 0$, n= 01; ESQ – $1,274 \pm 0,08306$, n= 05; ESQ + CH – $1,31 \pm 0,06651$, n= 05; ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$. Os dados foram normalizados pelo controle e a diferença entre os grupos foi testada utilizando o teste one-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.
 FONTE: PORTELA *et al*, 2018.

7 CONCLUSÃO

Esses achados sugerem que a esquizecefalia predispõe os animais a sofrerem convulsão hipertérmica na infância, por convulsionarem mais rápido quando comparados aos animais normais. Ademais, a convulsão hipertérmica e a esquizecefalia, em conjunto ou isoladas, contribuem para a epileptogênese, visto que geram convulsões mais severas na idade adulta.

Além disso, a malformação cortical promove um aumento da mielinização no córtex, na substância branca subcortical e no corpo caloso, o que deve fornecer um alicerce para a generalização da excitabilidade induzida pela hipertermia, facilitando o aparecimento de convulsões generalizadas, como a crise tônica com manutenção postural. Adicionalmente, a substância branca subcortical apresenta aumento na contagem de oligodendrócitos e na intensidade de mielina, mesmo na convulsão hipertérmica isolada, sugerindo um papel da mielinização para a facilitação da epileptogênese após convulsão hipertérmica isolada, mesmo na ausência de outra comorbidade associada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAM, J. A.; LODGE, D. Epileptiform activity induced by alkalosis in rat neocortical slices: block by antagonists of N-methyl-D-aspartate. **Neuroscience letters**, v. 83, n. 3, p. 345-350, 1987.
- AWAD, P.N; et al. Reducing premature KCC2 expression rescues seizure susceptibility and spine morphology in atypical febrile seizures. **Neurobiol Dis.** pii: S0969-9961(16)30035-3. 2016.
- BARKOVICH A.J; et al. Correlation of prenatal events with the development of polymicrogyria. **Am J Neuroradiol.** v.16 p. s822-s827. 1995.
- BARKOVICH, A. J; *et al.* A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. **Brain**; 135:1348–1369, 2012.
- BHASKARAN, M. D., AND SMITH, B. N. Effects of TRPV1 activation on synaptic excitation in the dentate gyrus of a mouse model of temporal lobe epilepsy. **Exp. Neurol.** 223, 529–536. 2010
- BAUMANN, N; PHAM-DINH, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. **Physiological reviews**, 2001.
- BEAR, M. F., *et al.* Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BELL, A., JACOBS, K.M. Early susceptibility for epileptiform activity in malformed cortex. **Epilepsy Res.** v.108 p.241-250, 2014.
- BERG A. T, SHINNAR S, *et al.* Unprovoked seizures in children with febrile seizures: short-term outcome. **Neurology.** V.47, p.562-8. 1996.
- BIRD L. M, SCAMBLER P. Cortical dysgenesis in 2 patients with chromosome 22q11 deletion. **Clin Genet.** v.58 p.64-68. 2000.
- BOCTI C, *et al.* The pathological basis of temporal lobe epilepsy in childhood. **Neurology.** v.60 p.191-195. 2003.
- BUTTERMORE, E. D., *et al.* Organization and maintenance of molecular domains in myelinated axons. **J Neurosci Res.** 91(5):603-22, 2013.
- CHUNG, S. Febrile seizures. **Korean J Pediatr.** v.57 p.384-395. 2014.
- CROSS, K. W; HEY, E. N; KENNAIRD, D. L; LEWIS, S. R; URICH, H. Lack of temperature control in infants with abnormalities of central nervous system. **Arch Dis Child.** 46(248):437-443. 1971.

DE BENEDICTIS, A., *et al.* Anatomico-functional study of the temporo-parieto-occipital region: dissection, tractographic and brain mapping evidence from a neurosurgical perspective. **Journal of anatomy**, v. 225, n. 2, p. 132-151, 2014.

De la MOTA C, *et al.* Polymicrogyria: epidemiology, neurological and anatomical factors and clinical outcome in a series of 34 cases. **An Pediatr (Barc)**. v. 75 p.358-364. 2011.

DENIS, D; *et al.* Schizencephaly: clinical and imaging features in 30 infantile cases. **Brain Dev**. 22(8):475-83. 2000.

DUBÉ C, *et al.* Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. **Ann Neurol**.V.57, p.152-5. 2005.

DUFFAU, H. Does post-lesional subcortical plasticity exist in the human brain?. **Neuroscience research**, v. 65, n. 2, p. 131-135, 2009.

DURANTE, M. E; CANCELIER, A. C. Prevalência de internações por convulsões febris em serviço de pediatria no sul do país: análise dos fatores associados. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v.36 p.7-11. 2007.

DVOFÁK, K., FEIT, J. Migration of neuroblasts through partial necrosis of the cerebral cortex in newborn rats contribution to the problems of morphological development and developmental period of cerebral microgyria - Histological and autoradiographical study. **Acta Neuropathol** 38:203–212, 1977.

EMERY, B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 779-782, 2010.

ENDRES S, *et al.* Interleukin-1 in the pathogenesis of fever. **Eur J Clin Invest**. V.17, p.469-74. 1987.

ENGELHARDT, E. *et al.* The brain subcortical white matter and aging: A quantitative fractional anisotropy analysis. **Dementia & Neuropsychologia**, 3(3):228-233, 2009.

FLOTATS-BASTARDAS M, *et al.* Clinical variability of polymicrogyria: report of 35 new cases and review of the literature. **Rev Neurol**. v. 55 p.321-329. 2012.

GEORGE, A. L., JACOBS, K. M. Altered intrinsic properties of neuronal subtypes in malformed epileptogenic cortex. **Brain Research**.V.1374 P.116-128, 2011.

GIBBS, S. *et al.* Long-term consequences of a prolonged febrile seizure in a dual pathology model. **Neurobiology of disease**, v. 43, n. 2, p. 312-321, 2011.

GUERRINI R, *et al.* Bilateral parasagittal parietooccipital polymicrogyria and epilepsy. **Ann Neurol**. v. 41 p.65-73. 1997.

GRIFFITHS, P. D. Schizencephaly revisited. **Neuroradiology**, v. 60, n. 9, p. 945-960, 2018.

INAN, C. et al. Schizencephaly accompanied by occipital encephalocele and deletion of chromosome 22q13.32: a case report. **Fetal and pediatric pathology**, v. 38, n. 6, p. 496-502, 2019.

HANSON, E., *et al.* Astrocyte membrane properties are altered in a rat model of developmental cortical malformation but single-cell astrocytic glutamate uptake is robust. **Neurobiol Dis.** 89:157-68, 2016.

HILL, R., *et al.* Modulation of oligodendrocyte generation during a critical temporal window after NG2 cell division. **Nat Neurosci.** 17, 1518–1527. 2014.

JACOBS, K. M., *et al.* Focal epileptogenesis in a rat model of polymicrogyria. **Journal of Neurophysiology.** V.81 p.159-173. 1999a.

JACOBS, K. M., *et al.* Mechanisms underlying epileptogenesis in cortical malformations. **Epilepsy Research.** V.36 p.165-188, 1999b.

JACOBS, K. M., *et al.* Postlesional epilepsy: the ultimate brain plasticity. **Epilepsia.** V.41p.S153-161. 2000.

JACOBS, K. M., PRINCE, D. A. Excitatory and inhibitory postsynaptic currents in a rat model of epileptogenic microgyria. **Journal of Neurophysiology.** V.93 p.687-696, 2005.

JIA, Y.F; LI, Y.C; TANG, Y.P; *et al.* Interference of TRPV1 function altered the susceptibility of PTZ-induced seizures. **Front Cell Neurosci.** 9:20. 2015.

KLEIM, J. A; JONES, T. A. Principles of Experience-Dependent Neural Plasticity: Implications for Rehabilitation After Brain Damage. **Journal of Speech, Language, and Hearing Research.** Vol. 51; S225–S239. 2008.

LEVENTER, R.J, *et al.* Malformations of cortical development and epilepsy. **Dialogues Clin Neurosci.** v. 10 p.47-62. 2008.

LOPES, C. F. *et al.* Epileptic features of patients with unilateral and bilateral schizencephaly. **Journal of child neurology**, v. 21, n. 9, p. 757-760, 2006.

LUHMANN, H. J. Models of cortical malformation—Chemical and physical. **Journal Of Neuroscience Methods**, [S.L.], v. 260, p. 62-72, 2016.

MACHADO, A. B. M; HAERTEL, L. M. Neuroanatomia funcional. 3. Ed. – São Paulo: Editora Atheneu. 2014.

MARQUES DIAS, M. J., HARMANT-VAN RIJCKEVORSEL, G. Prenatal cytomegalovirus disease and cerebral microgyria: Evidence for perfusion failure, not disturbance of histogenesis, as the major cause of fetal cytomegalovirus encephalopathy. **Neuropediatrics** 15:18–24, 1984.

MARTINEZ, A. M. B., *et al.* Neuro-histologia: Uma abordagem celular e sistêmica. 1. ed. Rubio. 2014.

MCBRIDE MC, KEMPER, T.L. Pathogenesis of four-layered microgyric cortex in

man. *Acta Neuropathol.* v.57 p.93-98. 1982.

MENDONÇA, H. R., *et al.* Activation of group I metabotropic glutamate receptors (mGluR) prevents LTP in microgyral cortex. **Society for Neuroscience abstract**, 2013.

MENDRONE JÚNIOR, A. Prevalência da infecção pelo citomegalovírus: a importância de estudos locais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v. 32 p. 7-8. 2010.

MIKI, Y. *et al.* An autopsy case of refractory epilepsy due to unilateral polymicrogyria in a 65-year-old man: Histogenesis of four-layered polymicrogyric cortex. *Neuropathology*, 35:569 – 574, 2015

NAVE, K. A; WERNER, H B. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, p. 503-533, 2014.

OUARDOUZ, M; *et al.* N-methyl-D-aspartate, hyperpolarization-activated cation current (I_h) and gamma-aminobutyric acid conductances govern the risk of epileptogenesis following febrile seizures in rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* v.31 p.1252-1260. 2010.

OUARDOUZ, M; CARMANT, L. Changes in inhibitory CA1 network in dual pathology model of epilepsy. *Channels (Austin).* v.6 p.18-25. 2012.

OU-YANG, T. P, *et al.* The Effects of Amiloride on Seizure Activity, Cognitive Deficits and Seizure-Induced Neurogenesis in a Novel Rat Model of Febrile Seizures. *Neurochem Res.* 2015.

PORTELA, D. M. *et al.* Camundongos com malformação cortical são predispostos à convulsão febril e possuem maior quantidade de oligodendrócitos. **VII Simpósio de Neurociências da UFF/II Simpósio de Neurociências UFF-FIOCRUZ.** 2018

PORTELA, D. M. *et al.* Alterações na mielinização e na quantidade de glicosaminoglicanos em camundongos com malformação cortical. **III Simpósio Brasileiro de Neurociências.** 2020.

RAJAB, E, *et al.* Cognitive performance and convulsion risk after experimentally-induced febrile-seizures in rat. *Int J DevNeurosci.* V.34, p.19-23. 2014.

ROSEN, G. D., *et al.* Changes in efferent and afferent connectivity in rats with induced cerebrocortical microgyria. *Journal of Comparative Neurology.* V.418 p.423-440, 2000.

ROSS, M. H; PAWLINA, W. *Histologia: texto e atlas – correlações com biologia celular e molecular.* 7. ed. Guanabara Koogan. 2016.

SALZER, J.L; ZALC, B. Myelination. **Curr Biol.** 26(20):R971-R975. 2016.

SAMPAIO-BAPTISTA, C. & JOHANSEN-BERG, H. White Matter Plasticity in the Adult Brain. *Neuron.* 96(6):1239-1251, 2017.

SANTOS, A. C. *et al.* Hemispheric dysplasia and hemimegalencephaly: imaging definitions. **Childs Nerv Syst**, 30:1813–1821, 2014.

SANES, D. H., *et al.* *Development of the nervous system.* 2nd. ed. Elsevier. 2006.

SCANTLEBURY, M.H., *et al.* Freeze lesion-induced focal cortical dysplasia predisposes to atypical hyperthermic seizures in the immature rat. **Epilepsia**. v. 45 p.592-600. 2004.

SCANTLEBURY, M.H., *et al.* Febrile seizures in the predisposed brain: a new model of temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol**. v.58 p.41-49. 2005.

SCHUCHMANN S, *et al.* Experimental febrile seizures are precipitated by a hyperthermia-induced respiratory alkalosis. **Nat Med**.V.12, p.817-23. 2006.

SCHÜZ, A; MILLER, R (Ed.). *Cortical areas: unity and diversity*. CRC Press, 2002.

SCOTT, R.C., *Consequences of febrile seizures in childhood*. **Curr Opin Pediatr**.V.26, p.662-7. 2014.

SILVA, E. *et al.* *Ciências biológicas: Realidades e virtualidades 2*. Atena: São Paulo; p. 4-8; 2021.

SHIBASAKI, K, *et al.* Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4. **J Neurosci**.2007, V.27, p.1566-75. 2007.

SHU, H-F., *et al.* Endogenous subventricular zone neural progenitors contribute to the formation and hyperexcitability of experimental model of focal microgyria. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 52, n. 4, p. 586-597, 2014.

STAFSTROM, C. E. Assessing the behavioral and cognitive effects of seizures on the developing brain. **Prog Brain Res**. v.135 p.377-390. 2002

STAFSTROM, C. E.; CARMANT, L. Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 6, p. a022426, 2015.

STADELMANN, C. *et al.* Myelin in the central nervous system: structure, function, and pathology. **Physiological reviews**, v. 99, n. 3, p. 1381-1431, 2019.

STURROCK, R.R. Myelination of the mouse corpus callosum. **Neuropathol Appl Neurobiol**. 6(6):415-20. 1980.

SUMINAITE, D., *et al.* Myelinated axon physiology and regulation of neural circuit function. **Glia**, v. 67, n. 11, p. 2050-2062, 2019.

SUN, F. J., *et al.* Increased expression of TRPV1 in the cortex and hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy. **J. Mol. Neurosci**. 49, 182–193. 2013.

TAKANASHI, J., BARKOVICH, A. J. The Changing MR Imaging Appearance of Polymicrogyria: A Consequence of Myelination. **AJNR Am J Neuroradiol**, 24:788–793, 2003.

TANAKA-ARAKAWA, M. M. *et al.* Developmental Changes in the Corpus Callosum from Infancy to Early Adulthood: A Structural Magnetic Resonance Imaging Study. **PLoS ONE**, 10(3): e0118760, 2015.

THRELKELD, S.W., *et al.* Age at developmental cortical injury differentially alters corpus callosum volume in the rat. **BMC Neurosci.** 2007

VAN ERUM, Jan; VAN DAM, Debby; DE DEYN, Peter Paul. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. **Epilepsy & Behavior**, v. 95, p. 51-55, 2019.

XIE, S. *et al.* Subcortical White Matter Changes with Normal Aging Detected by Multi-Shot High Resolution Diffusion Tensor Imaging. **PLoS ONE**, 11(6): e0157533, 2016.

YAGOUBI, N, *et al.* Hyperthermia-Induced Febrile Seizures Have Moderate and Transient Effects on Spatial Learning in Immature Rats. 2015.

YAKOVLEV, P.I., WADSWORTH, R.C. Schizencephalies; a study of the congenital clefts in the cerebral mantle; clefts with fused lips. **J Neuropathol Exp Neurol**; 5:116–130; 1946.

YU, S., *et al.* Upregulated expression of Nogo-A and NgR in an experimental Model of Focal Microgyria regulates the migration, proliferation and self-renewal of subventricular zone neural progenitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Ahead of print, 2016