UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FMRP-USP

Departamento de Cirurgia e Anatomia

MARCELO MENDONÇA DOS SANTOS

Evidências morfológicas e neurofarmacológicas da interação entre vias GABAérgicas e glutamatérgicas no núcleo do trato solitário como proposta de embasamento neurobiológico do efeito anticonvulsivo da estimulação do nervo vago

Ribeirao Preto

2022

MARCELO MENDONÇA DOS SANTOS

Evidências morfológicas e neurofarmacológicas da interação entre vias GABAérgicas e glutamatérgicas no núcleo do trato solitário como proposta de embasamento neurobiológico do efeito anticonvulsivo da estimulação do nervo vago

Tese apresentada à Área de Pós-graduação em Cirurgia e Anatomia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica – Cirurgia e Anatomia

Orientador: Prof. Dr. Hélio Rubens Machado

Ribeirao Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRAFICA

Dos Santos, Marcelo Mendonça

Evidências morfológicas e neurofarmacológicas da interação entre vias GABAérgicas e glutamatérgicas no núcleo do trato solitário como proposta de embasamento neurobiológico do efeito anticonvulsivo da estimulação do nervo vago

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Cirurgia e Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Rubens Machado

1. Epilepsia. 2. Núcleo do trato solitário. 3. Analgesia pós-ictal. 4. NMDA. 5. Núcleo Paragigantocelular. 6. Locus coeruleus. 7. Vias Glutamatérgicas e GABAérgicas

Nome: Dos Santos, Marcelo Mendonça

Título: Evidências morfológicas e neurofarmacológicas da interação entre vias GABAérgicas e glutamatérgicas no núcleo do trato solitário como proposta de embasamento neurobiológico do efeito anticonvulsivo da estimulação do nervo vago

Tese apresentada à Área de Pós-graduação em Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica /Cirurgia e Anatomia.

Aprovado em:		
Banca Examinadora:		
Prof. Dr	Instituição:	
	Assinatura:	
Prof. Dr.	Instituição:	
	Assinatura:	
Prof. Dr.	Instituição:	
	Assinatura:	
Prof. Dr.	Instituição:	
	Assinatura:	

AGRADECIMENTOS

Gostaria de Agradecer ao Prof. Dr Hélio, além de mestre, deus me deu a oportunidade de aprender com o senhor, paciência e compreensão em todos os momentos na elaboração da minha pesquisa para o desenvolvimento desde referido trabalho.

Aos Professores Coimbra e Wagner, meus grandes amigos e mestres que a vida me proporcionou, os ensinamentos e a vivência que levo em todos os momentos de minha existência aqui na terra vocês fazem a diferença em minha vida! Gratidão

Aos meus pais pelo dom da minha vida, meus avós, Armando e Ivonete (*in memoriam*) e a minha filha Marcella. Agradeço-lhes por me ensinarem a cultivar minha essência em todas as situações com muita fé e humildade.

Agradeço ao meu grande amigo Prof. Luiz Luciano Falconi pela amizade, carinho e ensinamentos ao logo de todo este processo!!! Gratidão!!!

Aos técnicos que me proporcionaram suporte com maestria Daoud, Afonso, Marquinhos, Yeda, Eleni, Tadeu (in memoriam), deus abençoe vocês sempre!!!

Gostaria de Agradecer imensamente o suporte financeiro por parte CAPES.

Resumo

Dos Santos, Marcelo Mendonça. Evidências morfológicas e neurofarmacológicas da interação entre vias GABAérgicas e glutamatérgicas no núcleo do trato solitário como proposta de embasamento neurobiológico do efeito anticonvulsivo da estimulação do nervo vago

A estimulação vagal tem sido uma opção terapêutica para o tratamento de um amplo espectro de síndromes epilépticas, sobretudo as do tipo parcial, para controle de crises convulsivas refratárias a medicamentos. Apesar dos resultados obtidos com o uso da terapia de estimulação do nervo vago, os trabalhos realizados até o momento não conseguiram estabelecer o mecanismo exato através do qual a estimulação vagal produz o esperado efeito anticonvulsivante. Oitenta por cento das aferências vagais projetam-se para o núcleo do trato solitário (NTS) e usam o glutamato como neurotransmissor. Não obstante, a inibição da atividade de receptores NMDA do NTS e não sua ativação, desencadeia um efeito antiepiléptico. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar uma possível interface entre aferências vagais glutamatérgicas e interneurônios inibitórios no NTS. Com esse intuito, ou um agonista (muscimol), ou um antagonista (bicuculina) de receptores GABAérgicos foi administrado no NTS, seguido pela microinjeção de um agonista glutamatérgico, como o NMDA, também no NTS, e, em sequência, foi feito um tratamento por via intraperitoneal com um inibidor ionóforo de canais de cloreto ligados ao GABA, o pentilenotetrazol, na dose de 64mg/kg. O efeito do bloqueio e da ativação de receptores GABAA no NTS foi estudado na intensidade das crises convulvivas e na analgesia pós-ictal induzidas pelo PTZ. A estimulação do nervo vago pode modular o locus coeruleus (LC), que se projeta ascendentemente para o neocórtex, por uma via indireta. Dessa forma, essa conexão foi também investigada por meio da microinjeção de um neurotraçador bidirecional (dextrana conjugada com AlexFlúor 488) no núcleo paragigantocelular lateral (NPGil), sabidamente conectado, por

meio de vias glutamatérgicas ao LC. Foi, por fim, feito um estudo imunoistoquímico da presença de fibras e pericários contendo vesículas transportadoras de GABA (vGAT) e de glutamato (vGlut) no NTS. O neurotraçamento de vias mostrou a presença de neurônicos do NTS conectados ao NPGil e evidências de terminações axônicas no LC, comprovando a presença de uma via conectando ao NTS ao NPGil e deste ao LC. Foi também demonstrada a presença de varicosidades positivas para vGlut em pericários de interneurônios GABAérgicos no NTS, sugerindo o recrutamento de interneurônios inibitórios GABAérgicos do NTS por aferências glutamatérgicas ao NTS, provenientes do nervo vago. O PTZ causou crises convulsivas tônico-clônicas, seguidas de antinocicepção pós-ictal. O pré-tratamento do NTS com muscimol, mas não com bicuculina causou um efeito anticonvulsivo. Esses dados sugerem que vias glutamatérgicas do nervo vago ao NTS recrutam interneurônicos GABAérgicos, os quais frenam uma via de saída do NTS, possivelmente inibitória, direcionada ao NPGil, o qual ativa o LC, promovendo uma inibição da atividade cortical epileptiforme.

Palavras chave- Núcleo do trato solitário. Analgesia pós-ictal. NMDA. Núcleo Paragigantocelular. Locus coeruleus. Vias Glutamatérgicas e GABAérgicas

ABSTRACT

Dos Santos, Marcelo Mendonça Morphological and neuropharmacological evidence of the interaction between GABAergic and glutamatergic pathways in the nucleus of the solitary tract as a proposed neurobiological basis for the anticonvulsant effect of vagus nerve stimulation

Vagal stimulation has been a therapeutic option for the treatment of a wide spectrum of epileptic syndromes, especially those of the partial type, to control seizures refractory to drugs. Despite the results obtained with the use of vagus nerve stimulation therapy, the work done so far has failed to establish the exact mechanism by which vagal stimulation produces the expected anticonvulsant effect. Eighty percent of vagal afferents project to the nucleus tractus solitarius (NTS) and use glutamate as a neurotransmitter. Nevertheless, inhibition of NMDA receptor activity of the NTS, and not its activation, triggers an antiepileptic effect. Thus, the aim of the present work has to investigate a possible interface between vagal glutamatergic afferents and inhibitory interneurons in the NTS. To this end, either an agonist (muscimol) or an antagonist (bicuculline) of GABAergic receptors was administered into the NTS, followed by microinjection of a glutamatergic agonist, such as NMDA, also into the NTS, and then intraperitoneally ionophore inhibitor of GABA-linked treated with an chloride channels, pentylenetetrazole, at a dose of 64mg/kg. The effect of blockade and activation of GABAA receptors in the NTS was studied on PTZ-induced seizure intensity and postictal analgesia. Stimulation of the vagus nerve can modulate the locus coeruleus (LC), which projects upward to the neocortex, by an indirect route. Thus, this connection was also investigated by microinjection of a bidirectional neurotracer (AlexFluor 488conjugated dextran) into the lateral paragigantocellular nucleus (NPGil), known to be connected via glutamatergic pathways to the LC. Finally, an immunohistochemical study of the presence of fibers and pericytes containing GABA (vGAT) and glutamate (vGlut) transport vesicles in the NTS was performed. The neurotracing of pathways showed the presence of NTS neurons connected to the NPGil and evidence of axon terminations in the LC, proving the presence of a pathway connecting the NTS to the NPGil and from the NPGil to the LC. We also demonstrated the presence of vGlut positive varicosities in pericytes of GABAergic interneurons in the NTS, suggesting recruitment of inhibitory GABAergic interneurons from the NTS by glutamatergic afferents to the NTS from the vagus nerve. PTZ caused tonic-clonic seizures, followed by postictal antinociception.

Pretreatment of the NTS with muscimol but not with bicuculline caused an anticonvulsant effect. These data suggest that glutamatergic pathways from the vagus nerve to the NTS recruit GABAergic interneurons, which frenzy an NTS output pathway, possibly inhibitory, directed to the NPGil, which activates the LC, promoting an inhibition of epileptiform cortical activity.

Keywords- Nucleo tractus solitarii. Postictal analgesia. NMDA. Paragigantocellular nucleus. Locus coeruleus. Glutamatergic and GABAergic pathways

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO
1.1 Epilepsia
1.2 Estimulação Vagal como tratamento de crises refratarias
1.3Considerações anatômicas e mecanismo da supressão de crises pela estimulação
do nervo vago
2-OBJETIVOS
2.1 Objetivos Gerais e Específicos
3-MATERIAIS E MÉTODOS
3.1 Animais e Comitê de Ética
3.2 Cirurgia para implante cânulas-guia em um núcleo sensitivo do nervo vago273.3 Indução de crises convulsivas e abordagem farmacológica do NTS28
3.4 Estudo Neuroanatômico: Cirurgia estereotáxica para a abordagem do núcleo reticular paragigantocelular
3.5 Mensuração do limiar nociceptivo
3.6 Drogas
3.7 Histologia
4-RESULTADOS
4.1 Analgesia pós ictal37
4.2 Figura- Efeito do pré-tratamento do núcleo do trato solitário (NTS) com
muscimol ou bicuculina, seguido por NMDA
4.3 Figura- Representação esquemática da administração de drogas no núcleo do
trato solitário (NTS)
4.4 Figura 7 – A-C: Fotomicrografia de uma seção transversal do núcleo
paragigantocelular lateral (NPGil), mostrando um local representativo (seta branca) de
microinjeção de neurotraçador (dextrano conjugado com <i>AlexaFluor 488</i>
6- CONCLUSÃO51
7-REFERÊNCIAS 53

Introdução

Introdução

1.1 Epilepsia

As epilepsias são desordens crônicas do cérebro, caracterizadas pela ocorrência de crises convulsivas, as quais são eventos de hiperativação e sincronização de grupos de neurônios, levando a alterações motoras, sensoriais, autonômicas e comportamentais (Stafstrom, 2006; Cunha *et al.*, 2009). De acordo com a Liga Internacional de Combate à Epilepsia (ILAE), existem diferentes tipos desta síndrome, cujos diagnósticos devem ser elaborados considerando-se aspectos morfológicos, eletroclínicos, genéticos e metabólicos (Berg *et al.*, 2010 - ILAE, 2009).

Com o avanço da compreensão dos sistemas de neurotransmissores, a partir da década de 70, surgiu a hipótese de que disfunções no sistema GABAérgico seriam responsáveis pelo desencadeamento e manutenção da atividade elétrica exacerbada e hipersincrônica do cérebro, o que levaria à geração de crises convulsivas (Meldrum, 1975). Juntamente com a hipótese GABAérgica, surgiram inúmeras drogas GABAmiméticas, sobretudo aquelas com ação no receptor ionotrópico GABAA associado a um canal de cloreto. A ativação desses receptores culmina no influxo de CL-, hiperpolarização do neurônio pós-sináptico e concomitante inibição da propagação de potencial de ação.

A partir da década de 90, com os avanços da biologia molecular e clonagem de vários receptores, o neurotransmissor excitatório glutamato e seus receptores, sobretudo os ionotrópicos NMDA, AMPA e cainato, passaram a ser considerados alvos na pesquisa de novos fármacos anticonvulsivantes (Czapinski *et al.*, 2005; Stefan e Feuerstein, 2007). Na epilepsia, a ativação dos receptores do ácido glutâmico (L-Glu) parece estar bastante envolvida com a iniciação e manutenção da atividade epiléptica. De fato, Rice & De Lorenzo (1998) demonstraram que a ativação dos receptores de L-Glu é essencial para o

desencadeamento das crises recorrentes no modelo de *status epilepticus* induzido por pilocarpina.

Nos últimos anos, tem sido aceito que a quebra do equilíbrio entre sistemas de neurotransmissores excitatórios e inibitórios pode estar subjacente ao desencadeamento das desordens epilépticas. Portanto, os alvos sinápticos das novas drogas antiepilépticas envolvem receptores, transportadores, canais iônicos e enzimas do metabolismo neural, cuja inibição ou exacerbação das atividades pode resultar no controle das crises convulsivas (Ängehagen *et al.*, 2004).

Além do GABA e do glutamato, alterações em outros neurotransmissores podem estar associadas ao desencadeamento de crises convulsivas, constituindo, portanto, alvos para atuação de anticonvulsivantes. Entre estes outros sistemas, encontram-se aqueles mediados por monoaminas.

Nesse sentido, Lazarova e Samanin (1983) demonstraram que a depleção seletiva de noradrenalina no prosencéfalo, potência crises convulsivas geradas por muitos convulsivantes químicos. Além disso, a lesão seletiva de neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos de ratos reduz a eficiência da estimulação vagal no bloqueio das crises convulsivas induzidas por PTZ e por eletrochoque (Browning *et. al.*, 1997). A injeção de noradrenalina sistemicamente, por sua vez, suprime crises convulsivas induzidas por PTZ (Krahl *et al.*, 2000).

O envolvimento alterações na liberação de serotonina na geração de crises convulsivas tem sido cada vez mais demonstrado em diversos modelos experimentais e em análises com tomografia de emissão de pósitrons (PET) utilizando [18F]FCWAY, um antagonista silencioso dos receptores 5-HT_{1A} (Theodore, 2006). Alguns estudos mostram que a ativação de receptores do tipo 5-HT_{1A} promove hiperpolarização da membrana por meio do aumento da condutância ao potássio, causando efeitos anticonvulsivantes *in vivo*

(Wada *et al.*, 1992), assim como diminuição da atividade elétrica epileptiforme em fatias de cérebro de ratos (Salgado e Alkadhi, 1995). Além disso, a fluoxetina, um inibidor da receptação de 5-HT, apresenta efeitos anticonvulsivantes contra crises audiogênicas em ratos GEPERS (*genetically epilepsy-prone rats*), as quais são potenciadas pela injeção de um antagonista de receptores serotoninérgicos, mas não de um agonista serotoninérgico (Browning *et al.*, 1997).

1.2 Estimulação vagal como tratamento de crises refratárias

A ideia de estimular o nervo vago para bloqueio de crises epilépticas foi inicialmente concebida há cerca de 100 anos pelo neurologista americano Leonard Corning (1855-1923). Corning baseou-se na hipótese de que o fluxo de sangue anormal para o cérebro seria responsável pelo desencadeamento das crises convulsivas. A técnica de Corning foi, no entanto, abandonada pelos neurologistas da época, permanecendo esquecida até os trabalhos de Jacob Zabara, realizados com cachorros, na década de 80. Em um desses trabalhos, Zabara e colaboradores (1985) demonstraram que crises convulsivas induzidas pela aplicação de estriquinina eram abolidas pela estimulação repetida do nervo vago de cães. Além deste, vários estudos demonstraram que a estimulação vagal reduz a frequência e severidades das crises, reduz os disparos interictais em diversos modelos experimentais de epilepsia, além de interferir na progressão do abrasamento elétrico do complexo amigdaloide (Lockard *et al.*, 1990; Woodbury e Woodbury, 1990; McLachlan, 1993 e Fernandez-Guardiola *et al.*, 1999).

Desde então, a estimulação vagal tem gradativamente se tornado uma opção terapêutica a ser considerada no tratamento de um amplo espectro de síndromes epilépticas, para controle de crises convulsivas refratárias ou resistentes a medicamentos (Lulic *et al.*, 2009; Terra *et al.*, 2012). O sucesso do procedimento tem sido atribuído à

eficiência no controle de crises convulsivas onde a terapia com medicamentos antiepilépticos tem falhado, com um índice mínimo de efeitos colaterais e uma melhora considerável na qualidade de vida dos pacientes (Ben-Menachem, 2002).

A técnica consiste no implante cirúrgico subclavicular de um pequeno gerador de estímulos elétricos, ligado a dois eletrodos helicoidais, os quais envolvem o nervo vago esquerdo na região cervical média anterior (figura 1).

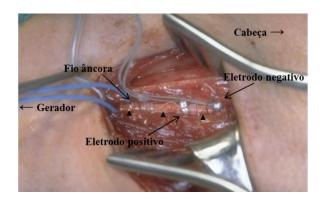


Figura 1— Eletrodo de estimulação vagal implantado no nervo vago esquerdo de um paciente. Em detalhe, pode-se observar que os eletrodos envolvem o nervo vago (pontas de flecha) e são conectados a fios subcutâneos que trazem os estímulos de um gerador (Modificado de Ben-Menachem, 2002).

Após o pós-operatório do implante dos eletrodos e gerador, a estimulação é iniciada. Esta consiste em pulsos elétricos de intensidade, duração e frequência estabelecidos pelo médico, os quais são administrados em intervalos pré-estabelecidos de modo semelhante a um marca-passo cardíaco. Além disso, o paciente pode ser orientado a ativar, por meio de uma pulseira magnética disposta no antebraço, estímulos elétricos adicionais quando da presença de auras, interrompendo o desencadeamento da crise (Lulic *et al.*, 2009).

Devido ao perfil de segurança, o uso da terapia de estimulação vagal tem sido incentivado em crianças epilépticas, uma vez que as drogas antiepilépticas existentes induzem uma série de alterações cognitivas que afetam diretamente o desenvolvimento

da criança. Atualmente, existem no mundo cerca de 10,5 milhões de crianças abaixo de 15 anos com algum tipo de epilepsia, o que representa 40% de todas as pessoas epilépticas (Guerrini *et al.*, 2006). Algumas evidências têm mostrado que a estimulação vagal pode ser eficiente como coadjuvante no tratamento de epilepsias generalizadas, epilepsias generalizadas idiopáticas refratárias, síndrome de Lennox-Gastaut e outras desordens resistentes a anticonvulsivantes que atingem a população pediátrica (Buoni *et al.*, 2004; Lulic *et al.*, 2009).

1.3 Considerações anatômicas e mecanismo da supressão de crises pela estimulação do nervo vago

Desde a aprovação para uso em humanos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1997, a estimulação vagal tem sido utilizada como terapia adjuvante para o tratamento de epilepsias refratárias a medicamentos em pacientes não candidatos à cirurgia de hemisferotomia ou de hemisferectomia. Apesar do amplo uso e dos resultados obtidos com a terapia, os trabalhos realizados até o momento não conseguiram estabelecer o mecanismo exato por meio do qual a estimulação do nervo vago produz efeito anticonvulsivante.

O nervo vago ou pneumogástrico é um nervo misto que transmite informação sensorial aos centros encefálicos superiores e informação motora a diversos órgãos. As aferências vagais conduzem informação ao encéfalo através de três tipos de fibras (Atkinson e Labiner, 2007):

- (a) Fibras A grande diâmetro, mielinizadas;
- (b)Fibras B diâmetro intermediário, mielinizadas;
- (c) Fibras C diâmetro pequeno, não mielinizadas.

Oitenta por cento destas aferências são axônios de neurônios cujos corpos localizam-se nos gânglios superior e inferior, que penetram o sistema nervoso central através do forame jugular e fazem sinapse com neurônios do núcleo do trato solitário (NTS) na região da medula oblonga. As fibras restantes fazem sinapse com neurônios do núcleo dorsal do nervo vago e neurônios do núcleo cuneado na área *postrema*. Os neurônios do NTS, por sua vez, se projetam para estruturas do tronco encefálico e para estruturas cerebrais superiores, dentre as quais se encontram o tálamo, o hipotálamo, o complexo amigdaloide e o córtex insular. As fibras aferentes vagais possuem sinapses excitatórias, as quais liberam glutamato e aspartato. Algumas das sinapses dos neurônios do NTS com núcleos do tronco encefálico são observadas no *locus coeruleus* e no núcleo dorsal da rafe, modulando a liberação de noradrenalina e de serotonina, respectivamente. Estes neurotransmissores exercem efeitos sobre estruturas límbicas, núcleos da formação reticular e estruturas autonômicas (figura 2).

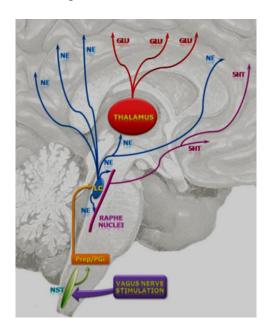


Figura 2— Vias através das quais o nervo vago provavelmente exerce controle sobre o córtex cerebral. Aferências vagais passam pelo núcleo do trato solitário (NTS) para o *locus coeruleus* (LC) via núcleo paragigantocelular (PGi) e núcleo prepósito do hipoglosso (Prep). Neurônios noradrenérgicos (NE) do LC projetam-se para o córtex, tálamo e núcleo dorsal da rafe (DRN). Os neurônios dos núcleos do DRN

fazem então sinapses glutamatérgicas e serotoninérgicas (GLU e 5HT) com neurônios corticais (Extraído de Fornai *et al.*, 2011).

As primeiras investigações a respeito dos mecanismos e estruturas envolvidos na supressão das crises, decorrente da estimulação vagal, mostraram que há uma diminuição da atividade elétrica encefálica e dessincronização dos disparos neuroniais. Em um desses trabalhos, Naritoku e colaboradores (1992) examinaram os potenciais auditivos evocados no tronco encefálico em três pacientes que receberam implantes de eletrodos de estimulação vagal. Esses autores observaram um significante prolongamento do intervalo entre potencial cérvico-medular para o tálamo-cortical, mas não nos parâmetros elétricos do tronco encefálico, o que, segundo os mesmos, pode indicar que a estimulação crônica do vago pode afetar circuitos não vagais.

Outros estudos utilizando ressonância magnética funcional e tomografia por emissão de pósitrons em seres humanos relataram um aumento no fluxo sanguíneo no tálamo direito e no córtex temporal direito com concomitante diminuição do fluxo sanguíneo no complexo amigdaloide e no hipocampo em consequência da estimulação vagal (Henry *et al.*, 1998).

O mecanismo neuroquímico por meio do qual as crises são inibidas pela estimulação vagal permanece desconhecido. No entanto, uma vez que a estimulação vagal suprime diferentes crises convulsivas originadas pela alteração de substratos específicos, pode-se supor que sinapses aferentes vagais exerçam um efeito modulatório sobre vários neurotransmissores (Zabara 1985; Lulic *et al.*, 2009; Fornai *et al.*, 2011). Hammond e colaboradores (1992) e Bem-Menachem e colaboradores (1995) revelaram aumento nas concentrações de metabólitos da serotonina e dopamina, bem como aumento nos níveis de GABA no líquido encéfalorraquidiano de pacientes epilépticos submetidos ao implante cirúrgico de eletrodo de estimulação vagal e uso de DAEs.

Naritoku e colaboradores (1995) examinaram as alterações moleculares subjacentes à estimulação vagal. Estes autores examinaram a expressão da proteína Fos no encéfalo de ratos da cepa Sprague-Dawley que receberam implantes de eletrodos de estimulação vagal e foram submetidos a crises convulsivas induzidas pela injeção de PTZ e por eletrochoque (MES). Estes autores demonstraram aumento da expressão da proteína Fos em alguns núcleos talâmicos, hipotalâmicos e amigdaloides, além do LC e do córtex occipital. Além disso, foi observado um aumento da expressão de proteína Fos em núcleos do nervo vago. Outros efeitos bioquímicos incluem superexpressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento de fibroblasto no hipocampo e no córtex cerebral. Ao mesmo tempo, foi demonstrado que ocorre diminuição na quantidade de mRNA para fator de crescimento neuronial no hipocampo e aumento da concentração de noradrenalina no córtex pré-frontal (Follesa *et al.*, 2007).

A atividade elétrica do encéfalo durante as crises, assim como durante períodos interictais tem sido analisada em pacientes epilépticos durante tratamento com estimulação vagal. Os dados obtidos nestes trabalhos são inconclusivos. Alguns autores reportam que a estimulação vagal induz uma redução na atividade elétrica encefálica, a qual se correlaciona com a redução na frequência das crises, mas não com os disparos epileptiformes interictais (Santiago-Rodriguez *et al.*, 2006). Além disso, pacientes não-responsivos à estimulação vagal, não apresentam parâmetros de atividade elétrica significativamente alterados. No entanto, de acordo com Kuba e colaboradores (2010), a estimulação vagal altera a frequência de disparos epileptiformes interictais, independentemente da frequência das crises convulsivas.

Outros autores demonstraram que ocorre uma redução na quantidade de disparos durante a estimulação vagal. No entanto, não há correlação entre esta redução e a diminuição no número de crises convulsivas (Lockard *et al.*, 1990). De fato, ainda não

foi estabelecido um padrão eletroencefalográfico durante a estimulação vagal (Hammond *et al.*, 1992; Rush *et al.*, 2005).

Curiosamente, comprovamos em um trabalho de mestrado predecessor, que o bloqueio, mas não a estimulação, de receptores NMDA do NTS causa efeito anticonvulsivante e uma significante redução da antinocicepção pós-ictal (dos Santos, 2017). Além disso, foi demonstrado, nesse mesmo trabalho, que a lesão neurotóxica seletiva de neurônios noradrenérgicos do LC reduziu a intensidade e duração da antinocicepção pós-ictal, provavelmente pelo prejuízo na atividade de vias cerúleo-espinais, e que a lesão neurotóxica de neurônios noradrenérgicos do LC associada à microinjeção de NMDA no NTS diminuiu a frequência de crises convulsivas tônico-clônicas induzidas farmacologicamente.

Assim também, foi demonstrado por outros autores que, dentre as estruturas que se interpõem entre os neurônios do NTS e o locus coeruleus, ressalta-se o núcleo reticular paragigantocelular (PGi) (Ruffoli et al., 2011). Os neurônios do PGi projetam-se ao locus coeruleus por meio de uma via excitatória glutamatérgica, que recruta receptores glutamatérgicos do tipo AMPA/kainato (Ennins e Aston-Jones, 1988; Aston-Jones et al., 1991). Já foi demonstrado também complexo que o reticular gigantocelular/paragigantocelular encontra-se envolvido na elaboração do fenômeno de antinocicepção pós-ictal (de Oliveira et al., 2016).

Em resumo, os dados obtidos por diferentes autores até o momento apontam para uma modificação da atividade cerebral decorrente da estimulação vagal mediada pela ativação de vias que conectam o NTS, o PGi, o *locus coeruleus* e o neocórtex. O mecanismo exato através do qual isso ocorre ainda precisa ser definido.

Com base no exposto, o presente trabalho pretende investigar as áreas envolvidas no efeito anticonvulsivante da terapia por estimulação vagal, bem como alguns dos mecanismos neuroquímicos envolvidos nesse fenômeno eletrofisiológico.

A hipótese do presente trabalho é que há uma interconexão entre o NTS, o PGi, o LC e o neocórtex, que pode ser recrutada durante a estimulação do nervo vago, elaborando pelo menos parte do efeito anticonvulsivo desse procedimento, durante o tratamento de epilepsias refratárias à farmacologia. É ainda possível que as conexões glutamatérgicas aferentes ao NTS recrutem interneurônicos GABAérgicos, ou do NTS ou de sua proximidade, resultando na modulação de uma via de saída inibitória que conecte o NTS ao NGil. A diminuição de atividade nas vias eferentes possivelmente inibitórias do NTS ao NGil poderia liberar a atividade de vias glutamatérgicas entre o NGil e o LC, resultando na ativação de vias noragrenérgicas cerúleo-corticais e cerúleoespinal, resultando em recrudecimento de crises convulsivas com implicações na elaboração da antinocicepção pós-ictal. Dessa forma, é possível que a microinjeçoes de um agonista de receptores GABAérgicos do tipo A, como o muscimol no NTS, seguida da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, também no NTS, causem um efeito atenuador da gravidade de crises convulsivas tônico-clônicas induzidas por administração periférica de PTZ, com consequente diminuição da intensidade da antinocicepção pós-ictal.

Objetivos

2-Objetivo Geral

Estudar o padrão de conexão entre o NTS, o PGi e o *locus coeruleus*, por meio de neurotraçamento de vias neurais, e a participação de receptores GABAérgicos do tipo A no NTS na modulação de crises convulsivas causadas por uma simulação de um aumento da atividade vagal, por meio da microinjeção de um agonista de receptores NMDA non NTS, e no controle da percepção à dor no estado pós-ictal.

2.1 Objetivos Específicos

- Estudar o padrão conectivo entre o NTs, o PGi e o locus coeruleus por meio de microinjeção de um neurotraçador bidirecional no PGi em Rattus norvegicvs;
- Investigar se as projeções glutamatérgicas ao NTS conectam-se com interneurônicos GABAérgicos no NTS, por meio de um estudo imunoistoquímica para determinar uma possível colocalização entre o transportador de vesículas glutamatérgicas com neurônicos positivos para o transportador de vesículas GABaérgicas no NTS.
- Estudar o efeito do pré-tratamento do núcleo do trato solitário (NTS) com um agonista seletivo de receptores GABAérgicos do tipo A, como o muscimol (350 pmol), seguido pela estimulação química dessa estrutura bulbar com uma microinjeção local de NMDA na severidade de crises convulsivas induzidas por PTZ e na intensidade da analgesia pós-ictal;
- Estudar o efeito do pré-tratamento do núcleo do trato solitário (NTS) com um antagonista seletivo de receptores GABAérgicos do tipo A, como a bicuculina (250 pmol), seguido pela estimulação química dessa estrutura bulbar com microinjeção local de NMDA na gravidade de crises convulsivas induzidas por PTZ e na intensidade da analgesia pós-ictal;

Material e Métodos

3- Material e Métodos

3.1 Animais

Ratos Wistar Hannover machos (200 a 240 g), adquiridos no Biotério Central da Universidade de São Paulo, *Campus* de Ribeirão Preto, foram acondicionados dois a dois em gaiolas e mantidos em biotério de manutenção ou do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, ou do departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de são Paulo com ciclo claro/escuro de 12/12hs (luzes às 7h), temperatura (25 °C) e umidade (55%) controladas. Água e alimentação *ad libitum* foram-lhes oferecidas. As normas da Sociedade Brasileira de Neurociências (SBNeC) foram obedecidas, evitando o sofrimento desnecessário aos animais. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (processo 2019.1697591) e da FFCLRP-USP (processo 2019.1697591).

3.2 Cirurgia para implante cânulas-guia em um núcleo sensitivo do nervo vago

Quarenta e oito horas após a sua chegada do biotério setorial, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica após anestesia geral com xilazina e cetamina, na proporção de 1 ml de cetamina a 10% (92 mg/kg, IP) e 2 ml de xilazina a 2% (10 mg/kg, IP) em um volume de 0,1 ml por cada 100 gramas de peso corporal. Uma cânula-guia, constituída de segmento de agulha de injeção hipodérmica (25X6 mm), de aço inoxidável, com 15 mm de comprimento, foi implantada na região dorsal do bulbo cranial, dirigindose ao NTS, segundo coordenadas aferidas, tomando-se o Bregma como referência: ântero-posterior (AP): -14,04mm; médio-lateral (ML): 0,4mm; e dorsoventral (DV): 7,7mm. Essas coordenadas foram obtidas a partir do atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (1997).

Após os procedimentos cirúrgicos, cada rato recebeu uma injeção de um fármaco anti-inflamatório e analgésico não esteroidal (banamine meglumine; 2,5 mg/kg, IP), além de uma associação antibiótica de largo espectro (Pentabiótico), administrados por via intramuscular profunda.

3.3 Indução de crises convulsivas e abordagem farmacológica do NTS

Para o estudo do papel de receptores GABAérgicos do tipo A do NTS no controle de crises convulsivas induzidas pelo bloqueio ionóforo de canais de cloreto ligados ao GABA, os animais foram gentilmente tomados e receberam um pré-tratamento com microinjeções de salina fisiológica (0,2µl), muscimol (350 pmol), ou bicuculina (250 pmol) no NTS, seguido, após 5 min, de microinjeção de NMDA (9 noml) na mesma estrutura, seguindo-se o tratamento IP com salina fisiológica ou PTZ (64 mg/kg).

Imediatamente após esse último procedimento, as crises convulsivas induzidas por administração periférica de PTZ foram analisadas com os animais individualmente colocados em uma arena circular feita de acrílico cristal. A incidência, a frequência e a gravidade das crises convulsivas induzidas pelo PTZ e a atividade motora registrada após a administração do veículo foram registradas através de análise comportamental considerando a classificação de Racine (1972) modificada por Freitas et alii (2013) para comportamento motor normal e patológico (convulsivo) (tabela 1).

de Freitas's index SCORE	SEIZING REACTION
0.0	Exploratory behaviour
1.0	Jaw and/or facial myoclonic reaction
	Short duration anterior paw myoclonus
2.0	Head myoclonia
	Moderate myoclonia of anterior paw with duration of at least 5 seconds
3.0	Tonic anterior limb extension
	Severe anterior paw myoclonic with duration of at least $10\ \mathrm{seconds}$
4.0	Complete tonic extension
	Rearing and severe myoclonia of the anterior paw
5.0	Complete tonic extension
	Rearing and falling, and also myoclonia of anterior and posterior paw

3.4 Estudo Neuroanatômico: Cirurgia estereotáxica para a abordagem do núcleo reticular paragigantocelular

Esta etapa morfológica do presente trabalho foi feita em grupos independentes de animais (N = 6, tendo havido atingidos sítios do núcleo gigantocelular e dois outros no núcleo espinal do nervo trigêmeo), após anestesia com xilazina e cetamina, na proporção de 1 ml de cetamina a 10% (92 mg/kg, IP) e 2 mL xilazina a 2% (10 mg/kg, IP) em um volume de 0,1 ml por cada 100 gramas de peso corporal. Foi realizada a tricotomia na pele da região da cabeça, e, seguida, os animais foram fixados em um aparelho estereotáxico (David Kopf), sendo a calvária exposta cirurgicamente após anestesia local com solução de cloridrato de lidocaína a 2% (xilocaína®) com vasoconstritor. Identificando-se o bregma, tomado como ponto de referência, estando, ainda, as suturas bregmática e lambdoide em um mesmo plano horizontal, trepanações foram realizadas na calvária. Uma cânula-guia, constituída de segmento de agulha de injeção hipodérmica (25X6 mm), de aço inoxidável, com 15 mm de comprimento e fixada ao estereotáxico, foi direcionada para no núcleo reticular paragigantocelular lateral, obedecendo às seguintes coordenadas: ântero-posterior: -10,05 mm; médio-lateral: 0,4 mm e dorso ventral: 9,2 mm (tomadas segundo o atlas estereotáxico para ratos, de Paxinos e Watson, 19

Foram feitas trepanações adicionais no crânio para a introdução de dois parafusos de ancoragem, e a cânula-guia foi fixada à calota craniana por meio de resina acrílica autopolimerisável. Um mandril de aço inoxidável de 0,3 mm de diâmetro foi introduzido no interior da cânula, para protegê-la de impurezas. Para uma melhor fixação da cânula, foi colocado um ponto de solda próximo a uma de suas extremidades, permitindo, dessa forma, melhor aderência da prótese de acrílico ao dispositivo de microinjeções de drogas no tecido encefálico.

Após cinco dias de pós-operatório, os animais foram submetidos aos procedimentos experimentais de neurotraçamento, que consistiram na microinjeção do neurotraçador biodextranas (peso molecular 3000) conjugada a *AlexaFluor* 488. Após os procedimentos cirúrgicos, cada rato recebeu uma injeção de um fármaco anti-inflamatório e analgésico não esteroidal (banamine meglumine; 2,5 mg/kg, IP), além de uma associação antibiótica de largo espectro (Pentabiótico), por via intramuscular profunda.

Após sete dias de sobrevida, os animais foram anestesiados, como explicitado acima, perfundidos por via intracardíaca e seus encéfalos foram submetidos a um processo de crioproteção (inclusão em solução de sacarose a 20 e a 20%; com 12 h em cada solução), congelados em gelo carbônico, após imersão em isopentano, seccionados em micrótomo de congelamento (CM 19509; Leica, Alemanha) e dispostos em lâminas de vidro ultratransparente, para então se processar a identificação da via que conecta o NTS, o PGi e o LC em microscopia de fluorescência (AxioImager Z1 com APOTOME; Zeiss, Alemanha).

Estudo Imunoistoquímico: Colocalização de terminais positivos para vGlut e pericários e neuritos positivos para VGAT

Em grupos uma reação antígeno-anticorpo foi realizada para a determinação de terminais glutamatérgicos no NTS recrutando interneurônios GABAérgicos nesse mesmo núcleo do nervo vago. Para esse determinado fim, os animais (N = 6) foram anestesiados, como descrito acima, perfundidos com solução de paraformaldeído a 4%, por via intracardíaca e tiveram o encéfalo removido, congelados, após crioproteção por imersão em solução contendo sacarose a 10 e a 20%, sendo posteriormente e seccionado para os experimentos de imuno-histoquímica de fluorescência segundo a técnica a seguir: Cortes histológicos 20 μm foram dispostos em lâminas não gelatinizadas extrabrancas; as

lâminas foram postas a secar por 1 h à temperatura ambiente; submetidas a uma lavagem em PBS por 1 h e 30 min; imersas em PBS no pernoite; lavadas em PBS; lavadas em PBS + 0,1M de glicina (3 min) (ou incubação em glicina dissolvida em água destilada a 1%, durante 30 min, para reduzir a fluorescência endógena); lavadas em PBS (5 min); lavadas em PBS + BSA 1%, em estufa a 37°C (30 min). Reação antígeno-anticorpo: As fatias de NTS foram incubadas com image-IT (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) por 1 h e foram simultaneamente incubadas com os seguintes anticorpos primários: IgG de camundongo monoclonal anti-VGLUT2 (anti-vesicular glutamate transporter 2), na diluição de 1:1000 (MAB5504, Sigma-Aldrich), IgG de coelho policional anti-VGAT (anti-vesicular GABA transporter), na diluição de 1:500 (cat. 131002, Synaptic Systems, Göttingen, Alemanha). As secções de tecido nervoso foram lavadas por três vezes (5 min cada) e foram simultaneamente incubadas com os seguintes anticorpos secundários: IgG de cabra conjugado com Alexa Flúor 488, anti-fragmento Fc de IgG de coelho, na proporção de 1:1000 e IgG de cabra anti-fragmento Fc de IgG de camundongo, conjugada à Alexa Flúor 647, na proporção de 1:1000 (cat. A-11032, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 120 min no escuro, e lavadas mais três vezes. Por fim, as lâminas foram cobertas com Fluoromount (Thermo Fischer Scientific, Jaguaré, SP, Brasil), as amostras foram levadas ao foto microscópio AxioImager Z1 (Zeiss).

3.5 Mensuração do limiar nociceptivo

Foi realizado uma linha de base (LB)para cada animal formada para aquisição do limiar nociceptivo. A LB foi formada pelamédia de três latências de retirada de cauda (LRC), tomadas em intervalos de 5 min entre elas (COIMBRA et al., 2006; FALCONI-SOBRINHO et al., 2017a, b). Todos os animais, imediatamente após o término do teste comportamental, foram submetidos ao teste de retiradade cauda. Cada animal foi colocado em uma cela de contenção com paredes de acrílico, e tiveram a cauda posicionada sobre o sensor de uma fonte de calor (analgesímetro para o teste de retirada de cauda; Oficinas de Precisão; FMRP-USP) (figura 6), cuja elevação progressiva de calorimetria era automaticamente interrompida, logo que o animal retirasse a cauda do dispositivo. O limiar nociceptivo foi mensurado em intervalos de 10 minutos durante 60 minutos.



Figura 4- Algesímetro utilizado para o teste de retirada de cauda.

3.6 Drogas

Nos experimentos morfológicos foram utilizados o neurotraçador fluorescente dextrana com peso molecular 3000, conjugada à Alexa Flúor 488 (Molecular Probes, USP), image-IT (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), IgG de camundongo monoclonal anti-VGLUT2 (MAB5504, Sigma-Aldrich), IgG de coelho policlonal anti-VGAT (cat. 131002, Synaptic Systems, Göttingen, Alemanha), IgG de cabra conjugado com Alexa Flúor 488, anti-fragmento Fc de IgG de coelho, IgG de cabra anti-fragmento Fc de IgG de camundongo, conjugada à Alexa Flúor 647 (cat. A-11032, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e Fluoromount (Thermo Fischer Scientific, Jaguaré, SP, Brasil). Nos experimentos neurofarmacológicos, foram utilizados o NMDA (agonista do receptor de ácido N-metil-D-aspártico; Sigma/Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) na dose de 9 nmol/0,2 µL (Ullah et al., 2017) ou veículo (solução salina fisiológica; 0,9 % NaCl/0,1µL), o agonista seletivo do receptor GABAA muscimol (5-Aminometil-3hidroxi-isoxazol) em uma dose de 250 pmol (Walker et al., 1999), o antagonista seletivo do receptor GABA_A metiliodeto de 1(S),9(R)-(-)-bicuculina {(5S)-5-[(6R)-6, 8-Dihidro-8-oxofuro[3,4-e]-1,3-benzodioxol-6-il]-5,6,7,8-tetra-hidro-6,6-dimetil-1,3dioxolo[4, 5-g]iodeto de isoquinolínio} em uma dose de 250 pmol (Walker et al., 1999) e o bloqueador de ionóforos do canal do receptor GABA_A pentilenotetrazol (α,β-Ciclopentametilenotetrazol) na dose de 64 mg/kg,. As microinjeções foram feitas unilateralmente, mas balanceando-se a abordagem de tais estruturas à direita e à esquerda do plano mediano.

3.7 Histologia

Após a finalização dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com cetamina (92mg/kg, IP) e xilazina (10 mg/kg, IP), seguindo-se uma incisão no tórax, com exposição do mediastino. O próximo passo foi clampear a aorta descendente torácica, libertando o coração do envoltório pericárdico, para o puncionamento do ventrículo esquerdo, por meio de um equipo sanguíneo conectado a uma seringa de 60 ml, e foi feita uma incisão no átrio direito, quando então os encéfalos foram perfundidos com solução salina a 0,9 %, seguida por solução de paraformaldeído a 4 %. Em seguida, os encéfalos foram removidos, seccionados em cortes coronais, para a obtenção de blocos de tecido nervoso, contendo todo a ponte e o bulbo. Os blocos assim obtidos foram levados ao criostato (HM 505 E, Microm, Zeiss), onde secções seriadas de 40 µm eram realizadas e adequadamente montadas em lâminas gelatinizadas; posteriormente desidratadas, diafanizadas e coradas com hematoxilina/eosina por meio de um sistema robotizado de coloração de lâminas (Leica CV5030 Auto stainer XL). Em seguida, eles foram analisadas ao microscópio de luz (AxioImger Z1, Zeiss), e os sítios de microinjeção de drogas foram assinalados em diagramas do atlas de Paxinos e Watson (1997).

Análise estatística

Os dados referentes à frequência e gravidade das crises convulsivas foram submetidos à análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. A duração e a latência das crises foram analisadas por meio da uma análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*), seguida do teste *post hoc* de Newman-Keul. Os dados dos limiares nociceptivos foram submetidos a uma análise de variância de medidas repetidas de duas vias (repeated measure *Two-way RM ANOVA*)

usando tratamento e tempo como fatores principais. No caso de interação significativa entre tratamento versus tempo, foram realizados os testes $post\ hoc$ de Newman-Keuls. Em todas as análises estatísticas, os valores foram relatados como média \pm erro padrão das médias (S.E.M.), e valores de P < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

4- Resultados

Efeito de microinjeções intra-NTS de muscimol ou de bicuculina, seguindo-se NMDA, na gravidade de crises convulsivas e na antinocicepção pós-ictal

Crises convulsivas tônico-clônicas

Segundo a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls, o grupo tratado com veículo (NTS) + veículo (NTS) + PTZ (i.p) exibiu um aumento na gravidade da convulsão (índice de Racine; F_{4,25} = 111,1; p < 0,001) e frequência de crises (F_{4,29}= 8,142; p < 0,001) quando comparado ao grupo tratado com veículo (NTS) + veículo (NTS) + veículo i.p. (grupo de controle tratado com veículo), como mostrado na Fig. 4A-B. Tanto o grupo tratado com veículo (NTS) + NMDA (NTS) + PTZ i.p., quanto o grupo tratado com MUSC (NTS) + NMDA (NTS) + PTZ i.p. exibiram uma diminuição na gravidade da convulsão em comparação com o grupo tratado com veículo (NTS) + veículo (NTS) + PTZ i.p. (p < 0,05), conforme mostrado na Fig. 6a.

Em relação à latência e duração das crises, houve efeitos significativos do tratamento ($F_{4,50}$ = 25,32; p < 0,001), latência/duração ($F_{1,50}$ = 12,71; p < 0,001) e da interação entre eles ($F_{4,50}$ = 53,16; p < 0,001), de acordo com a ANOVA de duas vias. O grupo tratado com veículo (NTS) + veículo (NTS) + PTZ i.p. mostrou uma diminuição significativa na latência de crises convulsivas (teste *post hoc* de Newman-Keuls; p < 0,05) e na duração das convulsões (teste *post hoc* de Newman-Keuls; p < 0,05) em comparação com as respostas do grupo tratado com veículo (NTS) + veículo (NTS) + veículo i.p., como mostrado na Fig. 4c. As respostas do grupo tratado com veículo (NTS) + NMDA (NTS) + PTZ i.p. não foram estatisticamente diferentes das do grupo tratado com veículo (NTS) + PTZ (i.p.), tanto considerando a latência das convulsões (p > 0,05), quanto a duração das crises convulsivas (p > 0,05), de acordo com o teste *post hoc* de Newman-Keuls. No entanto, o grupo tratado com MUSC (NTS) + NMDA (NTS) +

PTZ i.p. exibiu uma duração mais curta das convulsões quando comparado ao grupo tratado com veículo (NTS) + NMDA (NTS) + PTZ i.p., e o grupo tratado com BIC (NTS) + NMDA (NTS) + PTZ i.p. exibiu uma maior duração das convulsões quando comparado com os animais tratados com MUSC (NTS) + NMDA (NTS) + PTZ i.p. (p < 0,05 em ambos os casos), conforme mostrado na Fig. 4c.

4.1 Antinocicepção pós-ictal

De acordo com a RM-ANOVA, houve efeitos significantes do tratamento (F_{4,25} = 38,43; p < 0,001), do tempo (F_{13,325} = 15,54; p < 0,001) e da interação entre tratamento e tempo (F_{52,325}= 4,281; p < 0,001). O grupo tratado com veículo (NTS) + veículo (NTS) + PTZ i.p. exibiu um aumento significante nas latências de retirada de cauda de 0 a 80 min quando comparado ao grupo tratado com veículo (NTS) + veículo (NTS) + veículo i.p. (teste *post hoc* de Newman-Keuls; p < 0,05). Em contraste, tanto o grupo tratado com veículo (NTS) + NMDA (NTS) + PTZ i.p., como aquele tratado com MUSC (NTS) + NMDA (NTS) + PTZ i.p. exibiram uma diminuição significante nas latências de retirada de cauda na mesma janela de tempo em comparação com o grupo tratado com veículo (NTS) + veículo (NTS) + PTZ i.p. (teste *post hoc* de Newman-Keuls; p < 0,05 em ambos os casos), conforme mostrado na Fig. 4d. Os locais histologicamente confirmados das microinjeções de drogas são representados na Fig. 5.

Interações entre aferências glutamatérgicas e interneurônios GABAérgicos do NTS e vias NTS-NPGil-LC

Com o objetivo de caracterizar neuroquimicamente as aferências glutamatérgicas para o NTS e a presença de neurônios GABAérgicos nesse núcleo sensorial do nervo vago, além de caracterizar morfologicamente as vias NTS-NPGil-LC, realizou-se uma

dupla imunomarcação das fibras contendo VGLUT e pericários/nejuritos positivos para VGAT no NTS para identificar as aferências glutamatérgicas do nervo vago para os neurônios GABAérgicos situados no NTS e, em um experimento independente, microinjetou-se o neurotraçador dextrano conjugado com Alexa Flúor 488 no NPGil, conforme mostrado na Fig. 6A-C. O neurotraçador preencheu retrogradamente o pericário marcado com dextrano conjugado com Alexa Flúor 488 no NTS (Fig. 6D e E), indicando a presença de uma via neural conectando ao NTS ao NPGil. Também encontraram-se fibras marcadas com o neurotraçador no LC, indicando que as eferê ncias do NPGil projetam-se para os neurônios do LC (Fig. 6F). Aposições neuroniais marcadas com VGLUT também foram encontradas em todo o NTS (Fig. 6G e H), realizando aposições em dendritos e pericários de neurônios marcados com VGAT no NTS (Fig. 6G e Hh), sugerindo a existência de aferências glutamatérgicas do nervo vago para interneurônios GABAérgicos situados no NTS.

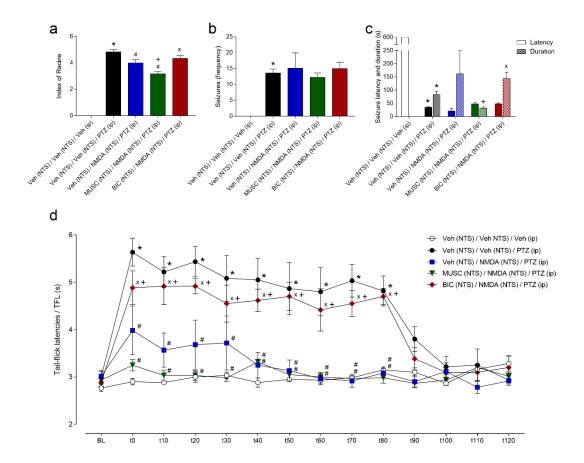


Figura 5 – Efeito do pré-tratamento do núcleo do trato solitário (NTS) com muscimol ou bicuculina, seguido por NMDA na gravidade (A), frequência (B), latência e duração (C) de crises convulsivas tônico-clônicas causadas por administração por via intraperitoneal de pentilenotetrazol (PTZ) e na percepção de estímulos nociceptivos no teste de retirada de cauda (D). Os dados são apresentados como médicas e erro padrão da média (n=6 animais por grupo); * p < 0,05 em relação ao grupo tratado com salina fisiológica (NTS) e PTZ (i.p.); \Box p< 0,05 em relação ao grupo tratado com salina/NMDA no (NTS) e PTZ (i.p.),; & p< 0,05 em relação ao grupo tratado com muscimol e em relação ao grupo tratado com bicuculina no (NTS) e PTZ (i.p.), em relação à *one-way ANOVA* (A-C) ou *repeated measures ANOVA* (D), seguidas pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

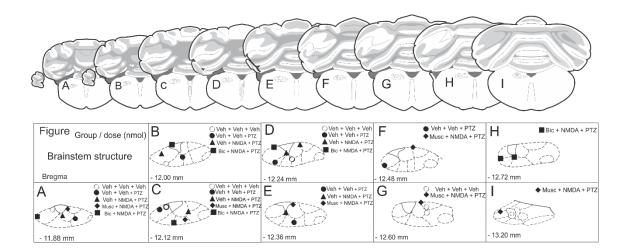


Figura 6 – Representação esquemática da administração de drogas no núcleo do trato solitário (NTS) de acordo com os seguintes procedimentos: (a) soro fisiológico (NTS) + soro fisiológico (NTS) + soro fisiológico (NTS) + soro fisiológico (NTS) + Salina (NTS) + PTZ ip (●) ou (c) Salina (NTS) + NMDA (NTS) + PTZ ip (▲), (d) Muscimol (NTS) + NMDA (NTS) + PTZ ip (◆), e (e) Bicuculina (NTS) + NMDA (NTS) + PTZ ip (■), representado em diagramas modificados do encéfalo de rato em coordenadas estereotáxicas do atlas de Paxinos e Watson (2005).

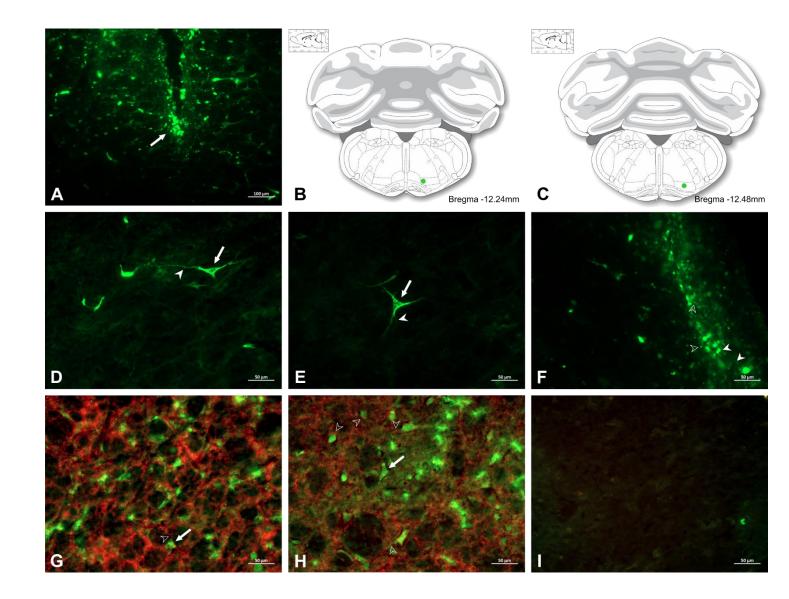


Figura 7 – A-C: Fotomicrografia de uma seção transversal do núcleo paragigantocelular lateral (NPGil), mostrando um local representativo (seta branca) de microinjeção de neurotraçador (dextrano conjugado com *AlexaFluor 488* (A) e desenhos de seções transversais da medula oblonga (B e C) mostrando sítios histologicamente confirmados (círculos verdes) de depósitos de neurotraçador no NPGil. D-F: Fotomicrografias de cortes transversais da medula oblonga (D e E) e da ponte (F), mostrando neurônios marcados com dextrano conjugado com *AlexaFluor-488* (setas brancas) e fibras neuroniais (pontas de seta fechadas) situados no núcleo do trato solitário (NTS)), além de fibras marcadas com neurotraçador (pontas de seta fechadas) e botões terminais (pontas de seta abertas) no *locus coeruleus* (F). G-I: Fotomicrografias de seções transversais NTS mostrando aposições glutamatérgicas marcadas com *AlexaFluor 647-VGLUT* (pontas de seta abertas) em dendritos e pericários (flechas brancas) marcados com *AlexaFluor 488-VGAT* de neurônios GABAérgicos situados em NTS de ratos Wistar. Como controle, o tecido NTS foi mostrado com a omissão de cada anticorpo primário (I).

Discussão

5- Discussão

O presente trabalho demonstrou a presença de uma via conectando o NTS, o NPGil e o LC que pode vir a ser recrutada durante o processo de estimulação do nervo vago para o tratamento de epilepsia refrataria à farmacologia em vigor. A ativação de receptores GABAérgicos do tipo A, com microinjeções de muscimol no NTS, mas não sua inativação com administrações de bicuculina no NTS, seguida da ativação de receptores NMDA nesse núcleo sensorial do nervo vago causaram efeito atenuador de crises convulsivas e com consequente diminuição da antinocicepção pós-ictal.

Esses dados sugerem que tanto a estimulação química NTS com NMDA, como o pré-tratamento desse núcleo bulbar com muscimol são procedimentos críticos para a elaboração da analgesia pós-ictal que segue crises convulsivas tônico-clônicas. O fato de que convulsões tônico-clônicas causam analgesia pós-ictal já foi descrito em seres humanos (Guieu et al., 1992) e em animais de laboratório (Coimbra et al., 2001a, b; Freitas et al., 2005). Esse fenômeno antinociceptivo parece ser dependente do recrutamento de núcleos ricos em serotonina (Freitas et al., 2005; 2008; 2009) e em noradrenalina (Freitas et al., 2005; Felippotti et al., 2011), como também já foi demonstrado o envolvimento de receptores opioides (Coimbra et al., 2001b; Felippotti et al., 2012), colinérgicos (de Oliveira et al., 2011; de Freitas et al., 2013) e serotoninérgicos (Freitas et al., 2009) nesse robusto fenômeno antinociceptivo. Contudo, esta é a primeira vez em que foi demonstrado o papel de receptores NMDA do NTS na elaboração da analgesia pós-ictal.

O efeito de agonistas GABAérgicos na atenuação da gravidade de crises convulsivas já foi experimentalmente demonstrado por outros autores (Walker et al., 1999). Não obstante, o presente trabalho oferece evidências inéditas referentes ao papel

crucial da neurotransmissão GABAérgica no NTS para a elaboração do fenômeno de antinocicepção pós-ictal. Foi demonstrado que a ativação, mas não o bloqueio de receptores GABAérgico do tipo A no NTS diminui a intensidade da analgesia pós-ictal.

Para explicar esse aparentemente paradoxal resultado, hipotetizamos através da imagem 3-A que fibras aferentes glutamatérgicas do nervo vago ao NTS projetam-se a interneurônios GABAérgicos do NTS, excitando-os e prejudicando tanto com a elaboração de crises convulsivas tônico-clônicas, como a antinocicepção pós-ictal. Por fim, ainda cogitamos a possibilidade de que esses interneurônios GABAérgicos controlem a atividade de neurônios também inibitórios, quiçá opioides, de uma via de projeção inibitória que conecta o NTS ao núcleo reticular paragigantocelular (PGi). Efetivamente, já foi demonstrado por outros autores que, dentre as estruturas que se interpõem entre os neurônios do NTS e o locus coeruleus, ressalta-se o PGi (Ruffoli et al., 2011). Os neurônios do PGi projetam-se ao locus coeruleus por meio de uma via excitatória glutamatérgica que recruta receptores glutamatérgicos do tipo AMPA/kainato (Ennins e Aston-Jones, 1988; Aston-Jones et al., 1991). Já foi demonstrado, também, que o complexo reticular gigantocelular/paragigantocelular encontra-se envolvido na elaboração do fenômeno de antinocicepção pós-ictal (de Oliveira et al., 2016). Assim, a saída excitatória também glutamatérgica do PGi excita o Locus coeruleus, cuja atividade modula o córtex cerebral através de uma via noradrenérgica ascendente.

Segundo dados obtidos por dos Santos et al. (2017), o bloqueio ionóforo dos canais de cloreto ligados ao GABA por meio de injeção de PTZ por via intraperitoneal provocou convulsões tônico-clínicas seguidas de antinocicepção pós-ictal. Tanto a gravidade das convulsões como a antinocicepção pós-ictal mostraram estar parcialmente dependentes da atividade de vias mediadas por aminoácidos excitatórios ligados ao NTS, considerando que o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no NTS e a

administração intratecal de uma neurotoxina (DSP4) seletiva para neurônios noradrenérgicos diminuíram a gravidade das convulsões tônico-clônicas, a intensidade das crises e a intensidade da antinocicepção pós-ictal. De fato, há evidências na literatura de que o sistema noradrenérgico está envolvido no controle da atividade cortical (Waterhouse et al., 1980; Chandler et al., 2014; Salgado et al., 2016). É sabido que o *locus coeruleus* (LC) é uma estrutura eminentemente noradrenérgica que envia ligações ascendentes que são distribuídas pelo neocórtex (Salgado et al., 2016), e conexões descendentes (Llorca-Torralba et al., 2016) que chegam a núcleos dorsais do corno posterior da medula espinal, modulando a atividade sináptica de vias ascendentes sensório-discriminativas da dor.

O LC é uma estrutura relevante do tronco cerebral, consistindo em sua maior fonte de noradrenalina, e vem sendo proposto como importante um relé intermediário possivelmente recrutado para que se estabeleça a atividade antiepiléptica causada pela estimulação do nervo vago (Fornai et al.,2011).

As fibras aferentes viscerais gerais (aferências parassimpáticas) e as fibras aferentes viscerais especiais (fibras gustativas que inervam a epiglote) dos neurônios dos gânglios sensoriais do nervo vago (especialmente os do gânglio inferior) projetam-se para a divisão caudal e craniana da NTS, e têm o L-glutamato como o principal neurotransmissor (Jean, 2001; Andressen et al., 1994; Furness et.al., 2012). O NTS, por sua vez, além de se ligar ao tálamo dorsal por meio do lemnisco trigeminal, também se liga à região ventrolateral da medula oblongata, especificamente com o núcleo reticular paragigantocelular lateral, cujos neurônios projetam-se para o LC (Aston-Jones et al.,1991; Ruffoli et al., 2011). Assim, seria de se esperar que a ativação de receptores de L- Glutamato no NTS causassem um efeito anticonvulsivo.

No entanto, como demonstrado por dos Santos (2017), a microinjecção de um agonista glutamatégico seletivo para o receptor NMDA no NTS em diferentes doses não foi capaz de alterar significativamente nem a gravidade das apreensões, nem a sua frequência, latência ou tampouco duração, embora a ativação dos receptores NMDA no NTS tenha significativamente diminuído a anticoncepção pós-ictal. Uma possível explicação para isso seria a presença de interneurônios inibitórios entre as projeções aferentes provenientes do neurônio primário dos gânglios sensoriais do nervo vago (especialmente o gânglio inferior do nervo vago) e neurônios do NTS. De fato, há relatos de que os neurônios GABAérgicos podem ser encontrados ao longo de todo o NTS (Torrealba e Müller, 1999; Bailey et al., 2008).

Além disso, os neurônios do NTS podem receber aferências glutamatérgicas e GABAérgicos de neurônios locais, que podem ser ativados por vias aferentes vagais ou modulados por vias aferentes provenientes de outros neurônios do tronco cerebral (Smith et al., 1998). Por outro lado, o bloqueio de receptores NMDA do NTS foi capaz de reduzir significativamente tanto a gravidade como a frequência das crises convulsivas, bem como causar uma redução significativa na analgesia pós ictal (dos Santos, 2017).

Esses dados corroboram dados prévios que sugerem que a microinjecção de um antagonista seletivo de receptores de aminoácidos excitatórios no NTS, o ácido cinurênico, pode causar efeito anticonvulsivo (Walker et al., 1999). dos Santos (2017) também demonstrou que lesões neurotóxicas das vias noradrenérgicas do tronco cerebral com DSP-4, uma neurotoxina que compete com o substrato da enzima beta-hidroxilase, apresentando ainda tropismo particularmente por neurônios do LC, diminui tanto a frequência das crises tônico-clônicas, como a antinocicepção pós-ictal.

Segundo o autor (dos Santos, 2017), esse efeito da injecção intratecal de DSP-4, associada à ativação dos receptores NMDA no NTS, pode ter sido devido aos seguintes

mecanismos neurais: (a) diminuição da ativação direta do LC pelos neurônios do NTS por meio de vias ascendentes noradrenérgicas cuja atividade resulta na modulação da atividade neocortical; b) diminuição da atividade dos neurônios noradrenérgicos do LC, consequente prejuízo na atividade de vias noradrenérgicas antinociceptivas descendentes, devido ao esgotamento da noradrenalina no LC, causado pelo DSP- 4.

Em resumo, este trabalho mostra evidências de que projeções aferentes do nervo vago ricas em glutamato recruta interneurônios GABAérgicos no NTS. A ativação de receptores GABAérgicos do tipo A no NTS seguida da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA também no NTS causa efeito anticonvulsivante. Foi também demonstrada uma conexão entre o NTS, o NPGil e o LC. Portanto, é possível que a estimulação do nervo vago, ative vias glutamatérgicas que, por sua vez, ativam interneurônios GABAérgicos no NTS que devem diminuir a atividade de via eferente potencialmente inibitória do DNTs ao NPGil, de onde já se sabe que há vias excitatórios glutamatérgicas que excitam o LC, recrutando ali receptores glutamatérgicos do tipo AMPA/Kainato. Por conseguinte, vias cerúleo-corticais excitatórias poderiam recrutar receptores alfa2-noradrenérgicos encefálicos pré-sinápticos, abortando crises Efetivamente, dependendo da localização convulsivas. do receptor alfa-2 noradrenérgicos, sua ativação pode ser inibitória ou facilitatória, modulando sinapses glutamatérgicas corticais. Nos sítios pré-sinápticos, tanto a noradrenalina, quanto a dopamina podem inibir a liberação de glutamato por meio da ativação de receptores α₂ e de receptores D₁, respectivamente, para controlar a abertura dos canais de Ca⁺⁺. Nos sítios pós-sinápticos, tanto a noradrenalina, quanto a dopamina podem facilitar a atividade excitatória mediada por receptores glutamatérgicos do tipo AMPA e NMDA por meio do recrutamento do receptor β e do receptor D_1 , ativando vias de sinalização de cAMP-PKA, respectivamente. Além disso, por inibindo a sinalização de cAMP-PKA, a noradrenalina

e a dopamina podem diminuir correntes excitatórias por meio da ativação de receptores α_2 e D_2 receptores, respectivamente. A ativação dos receptores D_2 também bloqueia correntes excitatórias recrutando a sinalização Akt-GSK3 (Xing et al., 2016). Pelo menos no que se refere às vias cerúleos-corticais, vias noradrenérgicas ascendentes poderão estar recrutando, pois, receptores alfa-2-pré-sinápticos, o que culminaria com uma ação anticonvulsivante, promovendo uma ação inibitória nas camas II e III do neocórtex (Salgado et al., 2011). A ação modulatória de aferências noradrenérgicas do LC ao neocórtex também poderia se dar por meio do recrutamento de interneurônios GABAérgicos corticais, como já foi descrito no córtex entorrinal (Lei et al., 2007).

No que se refere à analgesia pós-ictal, vias cerúleo-espinais descendentes facilitatórias aumentariam a atividade da primeira sinapse da via nociceptiva sensóriodiscriminativa ascendente, prejudicando a elaboração da antinocicepção pós-ictal. Não obstante, há evidências de que a lesão neurotóxica do LC com ácido ibotênico prejudica a elaboração da antinocicepção pós-ictal, assim como o bloqueio periférico tanto de receptores noradrenérgicos alfa, e beta (Freitas et al., 2005). Dessa forma, mais pesquisas necessitam ser realizadas para esclarecer o fenômeno aqui investigado. Uma possibilidade seria o recrutamento de interneurônios inibitórios do corno dorsal da medula espinal por vias cerúleo-espinais nesse último caso. Para determinar precisamente o processo de facilitação ou de inibição da primeira sinapse da via nociceptiva espinotalâmica ascendente por fibras cerúleo-espinais, uma precisa localização da origem de vias facilitatórias e inibitórias da dor no LC precisaria ser mais bem estabelecida. Por fim, poderíamos conjecturar que convulsões tônico-clônicas e antinocicepção pós-ictal são fenômenos inter-relacionados, interdependentes, e que a atenuação da gravidade de crises convulsivas com a ativação concomitante de receptores GABAérgicos do tipo A e glutamatérgicos do tipo NMDA no NTS, como aquela demonstrada em nossos

experimentos, causa uma atenuação concomitante da intensidade e duração da antinocicepção pós-ictal.

Espera-se, com os resultados obtidos neste estudo, que os mecanismos subjacentes à estimulação vagal como terapia para o tratamento de epilepsias intratáveis possam ser mais bem entendidos. Os dados poderão revelar alvos para o controle das crises convulsivas ainda inexplorados, podendo contribuir para busca de alternativas mais seguras e eficientes para o tratamento da grande parcela de pacientes epilépticos intratáveis. Por sua vez, tratamentos mais eficientes podem significar redução de custos de tratamento hospitalares e aumento da qualidade de vida para milhares de pessoas.

Conclusões

6- Conclusões

- Neurônicos do NTS projetam-se para o NPGil e pericários do NPGil conectam-se com o LC;
- Há um profuso recrutamento de interneurônicos GABAérgicos do NTS por fibras aferentes glutamatérgicas;
- A ativação de receptores GABAérgicos do tipo A no NTS seguida da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA nessa mesma estrutura produz efeito atenuador de crises convulsivas tônico-clônicas.

Referências Bibliográficas

7-Referências Bibliográficas

Acetylcholine-mediated neurotransmission within the nucleus raphe magnus exerts a key role in the organization of both interictal and postictal antinociception.

de Oliveira RC, de Oliveira R, Zanandréa PC, Paschoalin-Maurin T, Coimbra NC.

Epilepsy Behav. 2011 Oct;22(2):178-85. doi: 10.1016/j.yebeh.2011.06.029.

Epub **2011** Aug 6. PMID:21820966

Ängehagen, M.; Ben-Menachem, E.; Shank, R.; Rönnbäck, L.; Hansson, E. Topiramate modulation of kainate-induced calcium currents is inversely related to channel phosphorylation level. J Neurochem. 88(2): 320-325, 2004.

Atkinson, P.B.; Labiner, D.M. Shocking the wandering nerve-vagus nerve stimulation after a decade of widespread use. Eur Neurol Rev. 1:14-16, 2007.

Ben-Menachem, E.; Hambergerb, A.; Hednerc, T.; Hammondd, E.J.; Uthmand, B.M.; Slaterd, J.; Treigf, T.; Stefanf, H.; Ramsaye, R.E.; Wernickeg, J.F.; Wilderd B.J. Effects of vagus nerve stimulation on amino acids and other metabolites in the CSF of patients with partial seizures. Epilepsy Res. 20(3): 221-227, 1995.

Ben-Menachem, E.; Manon-Espaillat, R.; Ristanovic, R.; *et al.*Vagus nerve stimulation for treatment of partial seizures: 1. A controlled study of effect on seizures. First International Vagus Nerve Stimulation Study Group. Epilepsia. 35: 616-626, 1994.

Ben-Menachem, E. Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy. Lancet Neurol. 1: 477-82, 2002.

Berg, A.T.; Berkovic, S.F.; Brodie, M.J.; Buchhalter, J.; Cross, J.H.; van Em de Boas, W.; Engel, J.; French, J.; Glauser, T.A.; Mathern, G.W.; Moshé, S.L.; Nordli, D.; Plouin, P.; Scheffer, I.E. Revised terminology and concepts for organization of seizures

and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. Epilepsia. 51(4):676-85, 2010.

Bialer, M.; White, H.S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. Nature Reviews Drug Discovery. 9:68-82, 2010.

Brodie, M.J.; Kwan, P. Newer drugs for focal epilepsy in adults.BMJ. 344e345, 2012.

Browning, R.A.; Clark, K.B.; Naritoko, D.K.; Smith, D.C.; Jensen, R.A. Loss of anticonvulsant effect of vagus nerve stimulation in the pentylenetetrazol seizure model following treatment with 6-hydroxydopamine or 5,7-dihydroxy-tryptamine. ProcSocNeurosci. 2:23-35, 1997.

Buoni, S.; Mariottinib, A.; Pierib, S.; Zalaffib, A.; Farnetania, M.A.; Strambic, M.; Palmab, L.; Fois, A. Vagus nerve stimulation for drug-resistant epilepsy in children and young adults. Brain Dev. 26(3): 158–163, 2004.

Czapinski, P.; Blaszczyk, B.; Czuczwar, S.J. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. Curr Top Med Chem. 5:3-14, 2005.

De Oliveira, R.C.; de Oliveira R.; Biagioni, A.F.; Falconi-Sonrinho, L.L.; dos Anjos-Garcia, T.; Coimbra, N.C. Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors are recruited by acetylcholine-mediated neurotransmission within the locus coeruleus during the organisation of post-ictal antinocicpeption. Brain Res Bull. 127:74-83, 2016.

Dos Santos, M.M. Envolvimento de aferências glutamatérgicas ao núcleo do trato solitário e de vias noradrenérgicas do locus coeruleus no controle de convulsões e da antinocicepção pós-ictal em um modelo experimental de crises convulsivas tônicoclônicas (Tese), FMRP-USP, 81 p.p., 2017.

Dua, T.; de Boer, H.M.; Prilipko, L.L.; Saxena, S. Epilepsy care in the world: results of an ILAE/IBE/WHO global campaign against epilepsy survey. Epilepsia. 47:1225-31, 2006.

Engel, J.Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the Ilae task force on classification and terminology. Epilepsia . 2001;42:796-803.

Endogenous opioid peptide-mediated neurotransmission in central and pericentral nuclei of the inferior colliculus recruits μ1-opioid receptor to modulate post-ictal antinociception. Felippotti TT, de Freitas RL, Coimbra NC. Neuropeptides. 2012 Feb;46(1):39-47. doi: 10.1016/j.npep.2011.10.001. Epub 2011 Nov 21.

Effect of a nanostructured dendrimer-naloxonazine complex on endogenous opioid peptides µ1 receptor-mediated post-ictal antinociception.

Felippotti TT, do Carmo DR, Paim LL, Stradiotto NR, Bicalho Ude O, Parada CA, Grillo R, Fraceto LF, **Coimbra NC**. Nanomedicine. **2011** Dec;7(6):871-80. doi: 10.1016/j.nano.**2011**.02.005. Epub **2011** Mar 17

Fernandez-Guardiola, A.; Martínez, A.; Valdés-Cruz, A.; Magdaleno-Madrigal, V.M.; Martínez, D.; Fernandez-Mas, R. Vagus nerve chronic stimulation in cats: Effects on epileptogenesis (amygdala electrical kindling): behavioral and electrographic changes. Epilepsia, 40: 822-829, 1999.

Follesa, P.; Biggio, F.; Gorini, G.; Caria, S.; Talani, G.; Dazzi, L.; *et al*: Vagus nerve stimulation increases norepinephrine concentration and the gene expression of BDNF and bFGF in the rat brain. Brain Res. 1179:28-34, 2007.

Fornai, F.; Ruffoli, R.; Giorgi, F.G.; Paparelli, A. The role of locus coeruleus in the antiepileptic activity induced by vagus nerve stimulation. Eur J Neurosci. 33(12): 2169-2178, 2011.

5-HT1A/1B, 5-HT6, and 5-HT7 serotonergic receptors recruitment in tonic-clonic seizure-induced antinociception: role of dorsal raphe nucleus. Freitas RL, Ferreira CM, Urbina MA, Mariño AU, Carvalho AD, Butera G, de Oliveira AM, Coimbra NC. Exp Neurol. 2009 May;217(1):16-24. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.01.003. Epub 2009 Jan 14.

Guerrini, R. Epilepsy in children. Lancet.367:499-524, 2006. Hammond, E.J.; Uthman, B.M.; Reid, S.A.; Wilder, B.J. Electrophysiological studies of cervical vagus nerve stimulation in humans: I. EEG effects. Epilepsia. 33: 1013-1020, 1992

Handforth, A.; DeGiorgio, C.M.; Schachter, S.C.; Uthman, B.M.; Naritoku, D.K.; Tecoma, E.S.; Henry, T.R.; Collins, S.D; *et. al.* Vagus nerve stimulation therapy for partial-onset seizures: a randomized active-control trial. Neurology. 51(1):48-55, 1998.

Hartree, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem. 48:422-7, 1972.

Henry, T.R.; Bakay, R.A.E.; Votaw, J. R.; Pennell, P.B.; Epstein, C.M.; Faber, T.L.; Grafton, S.T.; Hoffnam, J.M. Brain blood flow alterations induced by therapeutic vagus nerve stimulation in partial epilepsy: I. Acute effects at high and low levels of stimulation. Epilepsia.39: 983-990, 1998.

Krahl, S.E.; Senanayake, S.S.; Handforth, A.Seizure suppression by systemic epinephrine is mediated by the vagus nerve. Epilepsy Res. 38(2-3):171-5, 2000.

Kovács, Z.; Czurkó, A.; Kékesi, A.K.; Juhász, G. Clomipramine increases the incidence and duration of spike-wave discharges in freely moving WAG/Rij rats. Epilepsy Res. 90:167-170, 2010.

Kuba, R.; Nesvadba, D.; Brázdil, M.;Oslejsková, H.;Ryzí, M.;Rektor, I. Effect of chronic vagal nerve stimulation on interictal epileptiform discharges. <u>Seizure</u>. 19(6):352-5, 2010.

Kudo, T.; Kushikata, T.; Kudo, M.; Kudo, T.; Hirota, K.; Antinociceptive effects of neurotropin in a rat model of central neuropathic pain: DSP-4 induced noradrenergic lesion. Neurosci Lett. 2011 Sep 26; 503(1):20-2.

Lanska, D. J.J.L. Corning and vagal nerve stimulation for seizures in the 1880s. Neurology. 12;58(3):452-9, 2002.

Lazarova, M.; Samanin, R. Potentiation by yohimbine of pentylenetetrazol induced seizures in rats: role of alpha 2 adrenergic receptors. Pharmacol ResCommun 15:419-425, 1983.

LaRoche, S.M.; Helmers, S.L. The new antiepileptic drugs: clinical applications. JAMA. 4;291(5):615-20, 2004.

Lei S, Deng PY, Porter JE, Shin HS. Adrenergic facilitation of GABAergic transmission in rat entorhinal cortex. J Neurophysiol. 2007 Nov;98(5):2868-77. doi: 10.1152/jn.00679.2007.

Lockard, J.S; Congdon, W.C; Ducharme, L.L; Feasibility and safety of vagal stimulation in monkey model. Epilepsia. 31(2 Suppl):S20-S26,1990.

Loscher, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. 50:105-123, 2002.

Loscher, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. Seizure. 20(5):359-68, 2011.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193:265-75, 1951.

Lulic, D.;Ahmadian, A.;Baaj, A.A.;Benbadis, S.R.; Vale, F.L.Vagus nerve stimulation.Neurosurg Focus. 27(3): E5, 2009.

McLachlan, R.S.; Suppression of interictal spikes and seizures by stimulation of the vagus nerve. Epilepsia. 34(5):918-23, 1993.

Meldrum, B.S. Epilepsy and gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition Rev Neurobiology. 17:1-36, 1975.

Morris, G.L.; Mueller, W.M. Long-term treatment with vagus nerve stimulation in patients with refractory epilepsy. The Vagus Nerve Stimulation Study Group E01-E05.Neurology. 10;53(8):1731-5, 1999.

Naritoku, D.K., Morales, A., Pencek, T.L. and Winkler, D. Chronic vagus nerve stimulation increases the latency of the thalamocortical somatosensory evoked potential. Pacing and Clinical Electrophysiology. 15:1572–1578, 1992.

Naritoku, D.K.; Terry, W.J.; Helfert, R.H. Regional induction of Fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. Epilepsy Res. 22(1):53-62, 1995.

Oliveira, R.C.; Oliveira, R.; Zanandréia, P.C.; Maurin, T.P.; Coimbra, N.C. Acetylcholine-mediated neurotransmission within the nucleus raphe magnus exerts a key role in the organization of both interictal and postictal antinociception. Epilepsy & Behavior (Print).2:178-185, 2011.

Paradoxical effect of noradrenaline-mediated neurotransmission in the antinociceptive phenomenon that accompanies tonic-clonic seizures: role of locus coeruleus neurons and α (2)- and β -noradrenergic receptors. Felippotti TT, dos Reis Ferreira CM, de Freitas RL, de Oliveira RC, de Oliveira R, Paschoalin-Maurin T, Coimbra NC. Epilepsy Behav. 2011 Oct;22(2):165-77. doi: 10.1016/j.yebeh.2011.06.028. Epub 2011 Aug 3. PMID:21813330

Racine, R.J.. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II, motor seizure. Electroencephal.Clin.Phisyol. 32: 281-294, 1972.

Raedt, R.;Clinckers, R.;Mollet, L.;Vonck, K.; El Tahry, R.;Wyckhuys, T.; De Herdt, V.;Carrette, E.;Wadman, W.;Michotte, Y.; Smolders, I.; Boon, P.;Meurs, A. Increased hippocampal noradrenaline is a biomarker for efficacy of vagus nerve stimulation in a limbic seizure model Neurochem. 117(3):461-9, 2011.

Rice, A.C.; DeLorenzo, R.J. NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy. Brain Res. 782:240-7, 1998.

Rush, A.J.;Marangell, L.B.;Sackeim, H.A.; George, M.S.; Brannan, S.K.; Davis, S.M., *et al*: Vagus nerve stimulation for treatment resistant depression: a randomized, controlled acute phase trial. Biol Psychiatry. 58:347–354, 2005.

Salgado, D.; Alkadhi, K.A. Inhibition of epileptiform activity by serotonin in rat CA1 neurons. Brain Res. 16;669(2):176-82, 1995.

Salgado H, Garcia-Oscos F, Patel A, Martinolich L, Nichols JA, Dinh L, Roychowdhury S, Tseng KY, Atzori M. Layer-specific noradrenergic modulation of inhibition in cortical layer II/III. Cereb Cortex. 2011 Jan;21(1):212-21. doi: 10.1093/cercor/bhq081.

Santiago-Rodríguez, E.; Alonso-Vanegas, M.; Cárdenas-Morales, L.; Harmony, T.; Bernardino, M.; Fernández-Bouzas, A. Effects of two different cycles of vagus nerve stimulation on interictal epileptiform discharges. Seizure. 15(8):615-20, 2006.

Schmidt, D.;Löscher, W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. Epilepsia. 46(6):858-77, 2005.

Serotonergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus recruits in situ 5-HT(2A/2C) receptors to modulate the post-ictal antinociception. Freitas RL, Bassi GS, de

Oliveira AM, Coimbra NC. Exp Neurol. **2008** Oct;213(2):410-8. doi: 10.1016/j.expneurol.**2008**.07.003. Epub **2008** Jul11.

Statnick, M.A.; Dailey, J.W.; Jobe, P.C.; Browning, R.A. Abnormalities in brain serotonin concentration, high-affinity uptake, and tryptophan hydroxylase activity in severe-seizure genetically epilepsy-prone rats. Epilepsia.37(4):311-21, 1996.

Stafstrom, C.E. Epilepsy: A review of selected advances in clinical practice and basic science. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 26: 83–1004, 2006.

Stefan, H.; Feuerstein, T.J. Novel anticonvulsant drugs. Pharmacol Ther. 113(1):165-83, 2007.

Szot, P., Miguelez, C., White, S.S., Franklin, A., Sikkema, C., Wilkinson, C.W., Ugedo, L., Raskind, A comprehensive analysis of the effect of DSP-4 on the locus coeruleus noradrenergic system in the rat. M.A. *Neuroscience* (2010)166: 279-291.

Terra, V.C.; Nisyiama, M.A.; Abrão, J.; Sakamoto, A.C.; Machado, H.R.; Arida, R.M.; Cavalheiro, E.A.; Scorza, F.A. Epileptologists probe vagus nerve stimulation in children with refractory epilepsy: a promise against sudden unexpected death in epilepsy. Arq.Neuropsiquiatr. 70(12): 953-955, 2012.

Theodore, W.H. Brain stimulation for epilepsy.Nat ClinPract Neurol. 1(2):64-5, 2005.

Theodore, W.H; Giovacchini, G.; Bonwetsch, R.; Bagic, A.; Reeves-Tyer, P.; Herscovitch, P.; Carson, R.E. The effect of antiepileptic drugs on 5-HT-receptor binding measured by positron emission tomography. Epilepsia. 47(3):499-503, 2006.

Xing B, Li YC, Gao WJ. Norepinephrine versus dopamine and their interaction in modulating synaptic function in the prefrontal cortex. Brain Res. 2016 Jun 15;1641(Pt B):217-33. doi: 10.1016/j.brainres.2016.01.005.

Wada, Y.; Nakamura, M.; Hasegawa, H.; Yamaguchi, N. Role of serotonin receptor subtype in seizures kindled from the feline hippocampus. NeurosciLett. 6;141(1):21-4, 1992.

Woodbury, D.M.; Woodbury, J.W. Effects of vagal stimulation on experimentally induced seizures in rats. Epilepsia. 31 Suppl 2:S7-19, 1990.

Zabara, J. Inhibition of experimental seizures in canines by repetitive vagal stimulation. Epilepsia. 33: 1005-1012, 1992.

Zabara, J. Peripheral control of hypersynchronous discharge in epilepsy. ElectroencephalogrClinNeurophysiol.61s:S162, 1985.

Zukin, S.R.; Young, A.B.; Snyder, S.H.Gamma-aminobutyric acid binding to receptor sites in the rat central nervous system, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 71:4802-7, 1974.