



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

**Avaliação da reatividade coronariana do coração isolado de ratos
submetidos ao modelo de indução de epilepsia pela pilocarpina**

PAULA RODRIGUES VITORINO

**GOIÂNIA-GO
2016**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Paula Rodrigues Vitorino

Título do trabalho: Avaliação da reatividade coronariana do coração isolado de ratos submetidos ao modelo de indução de epilepsia pela pilocarpina

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO¹**

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Paula Rodrigues Vitorino
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 09 / 07 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

PAULA RODRIGUES VITORINO

Avaliação da reatividade coronariana do coração isolado de ratos submetidos ao modelo de indução de epilepsia pela pilocarpina

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Diego Basile Colugnati

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino

GOIÂNIA-GO

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Rodrigues Vitorino, Paula

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CORONARIANA DO CORAÇÃO
ISOLADO DE RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE INDUÇÃO DE
EPILEPSIA PELA PILOCARPINA [manuscrito] / Paula Rodrigues
Vitorino. - 2016.

xvi, 57 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Diego Basile Colugnati; co-orientador Dr.
Gustavo Rodrigues Pedrino.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Epilepsia. 2. SUPED. 3. Sistema Cardiovascular. 4. Reatividade
Coronariana. 5. Bradicinina. I. Basile Colugnati, Diego, orient. II. Título.

CDU 612.1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 4

Aos dezenove dias do mês de setembro do ano de dois mil e dezesseis, às nove horas, no Anfiteatro do ICB2 da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Diego Basile Colugnati, Prof. Dr. Fernando Henrique Magalhães e Profa. Dra. Aline Priscila Pansani para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada "Avaliação da reatividade coronariana do coração isolado de ratos submetidos ao modelo de indução de epilepsia pela pilocarpina", em nível de mestrado, de autoria de **Paula Rodrigues Vitorino**, discente do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em cerca de 30 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1129 de maio de 2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, a dissertação foi Aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12 horas e 25 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
 29 Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Ciências Biológicas da
 30 Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que após lida e aprovada,
 31 será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual
 32 teor.

Prof. Dr. Diego Basile Colugnati

Presidente da Banca

Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Fernando Henrique Magalhães

Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Aline Priscila Pansani

Universidade Federal de Goiás

PAULA RODRIGUES VITORINO

**Avaliação da reatividade coronariana do coração isolado de ratos
submetidos ao modelo de indução de epilepsia pela pilocarpina**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Henrique Magalhães
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Aline Priscila Pansani
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Diego Basile Colugnati
Universidade Federal de Goiás

Aprovada em: ____/____/____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Marilda e Odeir, pelo exemplo de dedicação e perseverança, e pelo amor e apoio incondicional. A minha irmã, Camila, que sempre será minha melhor amiga.

Agradecimentos

À Deus, que nunca me abandonou, me deu forças e sabedoria para concluir esta caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Diego Basile Colugnati, pela orientação e importantes ensinamentos, pela confiança, paciência e auxílio nas dificuldades.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino, o qual, junto ao meu orientador, me deu a oportunidade de realizar este trabalho.

A Profa. Dra. Elizabeth Pereira Mendes, por sempre instruir diante de dúvidas e dificuldades durante os experimentos, ou até mesmo, fora deles.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro, pelos ensinamentos e incentivos.

A Profa. Dra. Fernanda C. A. dos Santos, por oferecer o Laboratório de Histofisiologia para a execução de parte dos experimentos, além da atenção, disponibilidade e ensinamentos.

A Me. Mônica Sousa Campos, que colaborou para a realização do trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Núcleo Integrado de Neurociências e Fisiologia Cardiovascular, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Em especial as minhas amigas Karina, Poliana e Aryanne.

**“Ninguém é suficientemente
perfeito que não possa aprender
com o outro e ninguém é totalmente
destituído de valores que não possa
ensinar algo ao seu irmão.”**

São Francisco de Assis

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Epilepsia	16
1.2 Epilepsia do Lobo Temporal	19
1.3 Modelo da pilocarpina	20
1.4 Morte súbita e inesperada nas epilepsias (SUDEP)	22
1.5 Alterações cardiovasculares na epilepsia	24
1.6 Morte Súbita Cardíaca (MSC) e Doença Arterial Coronariana (DAC)	27
1.7 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e estresse oxidativo na DAC.....	28
2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivo Específico	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Animais	31
3.2 Indução do modelo de epilepsia pela pilocarpina	31
3.3 Monitoramento por vídeo (confirmação do período crônico)	32
3.3.1 Grupos experimentais:.....	32
3.4 Preparo do coração isolado	33
3.5 Índice de hipertrofia.....	35
3.6 Análise Histológica.....	35
3.6.1 Coloração em hematoxilina e eosina (HE).....	36
3.6.2 Coloração em picrossírius	37
3.6.3 Marcação para estudo imuno-histoquímico	38
3.7 Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	42
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm , micrômetros

AST, Área de Secção Transversa

BK, Bradicinina

BPM, Batimentos por Minuto

CA, Corno de Amom

Ca^{+2} , Cálcio

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Cloreto de cálcio dihidratado.

CAT, catalase

DAB, 3,3-diaminobenzidina

$\text{dP/dt} +$, velocidade de contração intraventricular

$\text{dP/dt} -$, velocidade de relaxamento intraventricular

EEG-ECG, Eletroencefalocardiograma

EEG, Eletroencefalograma

ELT, Epilepsia do Lobo Temporal

eNOS, Óxido Nítrico Sintase endotelial

ERO, Espécies Reativas de Oxigênio

FC, Frequência cardíaca

HE, hematoxilina e eosina

ILAE, International League Against Epilepsy

i.p, Intraperitoneal

KCl, Cloreto de Potássio

KH_2PO_4 , Fosfato de potássio monobásico

M, Molar

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sulfato de magnésio heptahidratado.

mm, Milímetros

mM, Milimolar

mmHg, Milímetros de Mercúrio

NaCl, Cloreto de Sódio

NaHCO₃, Bicarbonato de Sódio

NPS, Nitroprussiato de Sódio

ON, Óxido nítrico

O₂^{·-}, Superóxido

PBS, Phosphate Buffered Saline

PID, Pressão Intraventricular Diastólica

PILO, Pilocarpina

PIS, Pressão Intraventricular Sistólica

PP, Pressão de Perfusão

RL, radicais livres

s.c, Subcutâneo

Ser¹¹⁶, Serina 116

SOD, Superoxide Dismutase

SOD-1, Superóxido dismutase cobre-zinco

SUDEP, Morte Súbita e Inesperada nas Epilepsias

TA, temperatura ambiente

Thr⁴⁹⁵, Treonina 495

VFC, Variabilidade da Frequência Cardíaca

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esclerose de endfolium e do Corno de Amom. Sloviter et al. Epilepsia. 2007

Figura 2. Protocolo de indução de epilepsia pela pilocarpina.

Figura 3. Preparação de Langendorff modificada. Aadaptado de: fac.org.ar/scvc/llave/tlibres/tl060/tl060i.htm.

Figura 4. Protocolo de avaliação da reatividade coronariana no coração isolado, com infusão de bradicinina (BK) e nitroprussiato de sódio (NPS).

Figura 5. Parâmetros basais, dos grupos controle e epilepsia. (A) Pressão Intraventricular Sistólica (PIS), (B) Pressão Intraventricular Diastólica (PID), (C) dP/dt +, (D) dP/dt -, (E) Frequência Cardíaca (FC), (F) Pressão de Perfusão (PP). Controle n=8, epilepsia n=8, teste t de student.

Figura 6. Porcentagem de relaxamento coronariano: (A) induzido por bradicinina (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} M), e (B) induzido por nitroprussiato de sódio (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M), observado na variação de pressão de perfusão dos grupos controle e epilepsia. * Indica diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Controle n=8, epilepsia n=8, two-way ANOVA, pós-teste de Fisher.

Figura 7. Porcentagem de variação de: (A) Pressão Intraventricular Sistólica (PIS), (B) Pressão Intraventricular Diastólica (PID), (C) dP/dt +, (D) dP/dt -, (E) Frequência Cardíaca (FC), (F) Pressão Desenvolvida no ventrículo esquerdo, mediante a infusão de bradicinina nas concentrações (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} e 10^{-5} M). Controle n=8, epilepsia n=8, two-way ANOVA, pós-teste de Fisher.

Figura 8. Porcentagem de variação de: (A) Pressão Intraventricular Sistólica (PIS), (B) Pressão Intraventricular Diastólica (PID), (C) dP/dt +, (D) dP/dt -, (E) Frequência Cardíaca (FC), (F) Pressão Desenvolvida no ventrículo esquerdo, mediante a infusão de nitroprussiato de sódio nas concentrações (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M). Controle n=8, epilepsia n=8, two-way ANOVA, pós-teste Fisher.

Figura 9. Expressão imuno-histoquímica de óxido nítrico sintase endotelial nas artérias. (A) Células marcadas no grupo controle (Objetiva de 100x). (B) Células marcadas no grupo epilepsia (Objetiva de 100x). (C) Porcentagem de vasos sem marcação, com até 50%, de 50 a 75%, e com mais de 75% de marcação do perímetro para eNOS.

Figura 10. Expressão imuno-histoquímica de superóxido dismutase nas artérias. (A) Células marcadas no grupo controle (Objetiva de 100x). (B) Células marcadas no grupo epilepsia (Objetiva de 100x). (C) Porcentagem de vasos sem marcação, com até 50%, de 50 a 75%, e com mais de 75% de marcação do perímetro para SOD-1.

Figura 11. Expressão imuno-histoquímica de catalase nas artérias. (A) Células marcadas no grupo controle (Objetiva de 100x). (B) Células marcadas no grupo epilepsia (Objetiva de 100x). (C) Porcentagem de vasos sem marcação, com até 50%, de 50 a 75%, e com mais de 75% de marcação do perímetro para catalase.

Figura 12. Razão entre o peso do coração (ventrículos esquerdo e direito) e o comprimento da tíbia do animal. Controle n=8, epilepsia n=8, teste t de student.

Figura 13. Morfometria dos cardiomiócitos. Cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em corte transversal do grupo controle (A) e do grupo epilepsia (B) (HE, objetiva de 20x). (C) Análise da área de secção transversa dos cardiomiócitos. Número de cardiomiócitos analisados: controle n=200, epilepsia n=200. * Indica diferença estatística em relação ao controle ($p<0,05$), teste t de student.

Figura 14. Análise da porcentagem de colágeno intersticial. A e B: imagens colágeno intersticial observado sob luz natural no controle e epilepsia, respectivamente (picrossírius, objetiva de 20x). C e D: imagens colágeno intersticial observado sob luz polarizada no controle e epilepsia, respectivamente (picrossírius, objetiva de 20x). E: porcentagem de colágeno intersticial, teste t de student.

Figura 15. Análise da porcentagem de colágeno perivascular. A e B: imagens colágeno perivascular observado sob luz natural no controle e epilepsia, respectivamente (picrossírius, objetiva de 20x). C e D: imagens colágeno perivascular observado sob luz polarizada no controle e epilepsia, respectivamente (picrossírius, objetiva de 20x). E: porcentagem de colágeno perivascular. * Indica diferença estatística em relação ao controle ($p<0,05$), teste t de student.

Figura 16. Avaliação de revascularização. A e B: Regiões do ventrículo esquerdo dos grupos controle e epilepsia, respectivamente (HE, objetiva de 10x). C: Quantificação absoluta de artérias no ventrículo esquerdo. * Indica diferença estatística em relação ao controle ($p<0,05$). Controle n=8, epilepsia n=8, teste t de student.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução de Krebs-Ringer.

Tabela 2. Anticorpos, fabricantes, diluição, e tempo de exposição ao DAB dos anticorpos primários utilizados no estudo imuno-histoquímico.

RESUMO

A epilepsia uma das doenças neurológicas crônicas graves mais comuns, caracterizada por descargas paroxísticas, excessivas e sincrônicas de uma população neuronal que leva a crises espontâneas e recorrentes. A morte súbita e inesperada nas epilepsias (SUDEP) é responsável por 7,5% a 17% das mortes em epilepsia. Embora os mecanismos fisiopatológicos sejam desconhecidos, uma possível explicação é que sejam de origem cardiogênica. Alguns trabalhos relacionam alterações cardíacas com as crises, podendo estas serem responsáveis pela SUPED, e como ainda não tem trabalhos que tenham investigado o controle do fluxo coronariano de pacientes ou em modelos experimentais de epilepsia, e como as doenças coronarianas figuram como uma das principais causas de morte súbita na população mundial, avaliar o fluxo coronariano em modelo experimental de epilepsia torna-se importante para o entendimento da SUDEP. Assim este trabalho teve como objetivo avaliar a reatividade coronariana, função ventricular e o tecido cardíaco de ratos submetidos ao método de indução de epilepsia pelo modelo da pilocarpina. Os animais foram separados em dois grupos: Controle (n= 8) e Epilepsia (n= 8). Foi administrado 350 mg/Kg de pilocarpina (i.p.) precedidos por 1mg/Kg de metilescopolamina (s.c.) em ambos os grupos, os animais que entraram em estado de mal epiléptico receberam diazepam 10 mg/Kg (i.p.), após 3 horas em estado de mal epiléptico, para bloqueá-lo. Depois os animais foram acondicionados em uma sala para monitoramento por vídeo (24 h/dia) até completarem 2 meses de epilepsia, formando o grupo epilepsia. Os animais que não entraram estado de mal epiléptico após a indução do modelo compuseram o grupo controle, ficando alojados no mesmo ambiente dos animais do grupo epilepsia durante todo o período. Após a cronificação da epilepsia (2 meses após primeira crise) realizou-se a metodologia de coração isolado pelo sistema de Langendorff fluxo constante, e após um período de estabilização de cerca de 35 minutos perfundiou-se o coração com bradicinina (BK) (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} M) em bolus e após lavagem perfundiou-se com nitroprussiato de sódio (NPS) (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , e 10^{-3} M) também em bolus. O coração dos ratos com epilepsia apresentou uma redução significativa no relaxamento coronariano mediante infusão de BK na concentração 10^{-5} M. Além disso, observamos que os animais com epilepsia possuem colágeno perivascular aumentado, cardiomiócitos maiores, e maior número de coronárias, sem alteração da expressão de óxido nítrico sintase endotelial

(eNOS), superóxido dismutase (SOD) e catalase. Assim, nossos resultados mostram que há uma redução do relaxamento coronariano induzido por bradicinina o que nos leva crer em prejuízo da função endotelial desses animais, uma vez que, embora com fibrose perivascular não houve alteração quando o relaxamento foi induzido pelo nitroprussiato de sódio.

Palavras-Chave: epilepsia, SUPED, sistema cardiovascular, reatividade coronariana, bradicinina.

ABSTRACT

Epilepsy is the most common chronic neurological disease in the world, characterized by paroxysmal, excessive and synchronous discharges of a neuronal population that leads to spontaneous and recurrent seizures. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) is responsible for 7.5% to 17% of deaths in epilepsy. Although the pathophysiological mechanisms are unknown, one possible explanation is that they are of cardiogenic origin. Some studies relate cardiac abnormalities with seizures, and these may be responsible for SUDEP, and as yet has no works that have investigated the control of coronary flow of patients or in experimental models of epilepsy, and as coronary heart disease listed as one of the main causes of sudden death in the world population, assess coronary flow in experimental epilepsy model becomes important for the understanding of SUDEP. So this study aims to evaluate the coronary reactivity, ventricular function and cardiac tissue of rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. The animals were separated into two groups: control (n = 8) and epilepsy (n = 8). It was administered 350 mg/kg of pilocarpine (i.p) preceded by 1mg/kg methylscopolamine (s.c) in both groups, animals that entered in *status epilepticus* received diazepam 10 mg/kg (i.p) after 3 hours to block it. After that, the animals were placed in a room for video monitoring (24 h/day) until complete two months of epilepsy (epilepsy group). Rats that received pilocarpine and did not develop *status epilepticus* comprised the control group, being housed in the same animal environment that epilepsy group. At two months of chronic epilepsy rats were sacrificed and the heart dissected to the Langendorff preparation (constant flow), after a 35 minutes of stabilization in a Krebs - Ringer solution bradykinin (BK) was administered (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} M) in bolus and after of washout was treated with sodium nitroprusside in different concentrations (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M) also bolus. They were found in animals with epilepsy a significant reduction in coronary relaxation by BK infusion at a concentration 10^{-5} M. It was observed that rats with epilepsy have increased perivascular collagen, larger cardiomyocytes, and more coronary arteries, with no change of nitric oxide synthase endothelial (eNOS), superoxide dismutase (SOD) and catalase expression. Thus, our results show reduction of coronary relaxation induced by bradykinin which leads us to believe in loss of endothelial function of these animals, since, we did not observe differences in relaxation induced by sodium nitroprusside, despite the perivascular fibrosis of epileptic rats.

Keywords: epilepsy, SUPED, cardiovascular sistem, coronary reactivity, bradykinin.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia é uma das doenças neurológicas crônicas graves mais comuns (LAXER et al., 2014; BANERJEE et al., 2009; FORSGREN et al., 2005; SANDER, 2003), e ocorre devido a um distúrbio caracterizado por uma predisposição persistente do cérebro em gerar crises epiléticas, e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais que acompanham esta condição (FISHER et al., 2005). A definição de epilepsia requer a ocorrência de pelo menos duas crises epiléticas ou de uma crise com forte predisposição a desencadear uma segunda crise, como a presença de traçados epileptiformes no eletroencefalograma (EEG) (FISHER et al., 2014). Essas se manifestam de forma espontânea e recorrente (DICTER, 1994), e são uma ocorrência de sinais e/ou sintomas devido a atividade neuronal anormal excessiva e sincrônica no cérebro que ocorre durante a epilepsia (FISHER et al., 2005).

A epilepsia atinge aproximadamente 65 milhões de indivíduos em todo o mundo (LAXER et al., 2014; BANERJEE et al., 2009; FORSGREN et al., 2005; SANDER, 2003). Os fatores etiológicos mais comuns são febre, distúrbio eletrolítico, intoxicação, doenças degenerativas (PEDLEY; BAZIL; MORRELL, 2000), tumores e acidente vascular encefálicos, traumatismo crânio-encefálico, e infecções do sistema nervoso central (DUNCAN et al., 2006). A alta incidência das epilepsias nos países em desenvolvimento é decorrente da deficiente assistência pré-natal e maternal, alto índice de prematuridade, desnutrição, traumas durante o parto, convulsões febris da infância e infecções, particularmente as infecções decorrentes de parasitismo (SANDER; SHORVON, 1987; FERNANDES et al., 1999), além de infecções endêmicas (neurocisticercose e malária) que se apresentam como principais fatores de risco (DUNCAN et al., 2006).

A Comissão sobre Classificação e Terminologia da Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE do inglês International League Against Epilepsy) é a responsável por atribuir conceitos, terminologias e abordagens para a classificação de crises e formas de epilepsia, afim de trazer a epilepsia para fora das “sombras” da opinião de

especialistas e dos argumentos dominantes, para que a classificação das epilepsias reflita totalmente e avance, tanto no que se refere à neurociência básica como em estudos clínicos possibilitando, de maneira mais eficaz, a incorporação do conhecimento produzido à prática clínica. Assim, a ILAE classificou as crises em: crises epiléticas generalizadas e crises epiléticas focais (BERG et al., 2010).

Crises epiléticas generalizadas são caracterizadas como as que se originam em algum ponto envolvendo rapidamente redes distribuídas bilateralmente (ambos hemisférios cerebrais). Essas redes bilaterais podem incluir estruturas corticais e subcorticais, mas não necessariamente o córtex inteiro. Embora o início de uma crise generalizada em um indivíduo mostre sempre o mesmo padrão a localização e lateralização não são, necessariamente, idênticas de uma crise à outra, podendo inclusive ser assimétricas no que se refere ao padrão de recrutamento bilateral (BERG et al., 2010). As crises generalizadas são classificadas em crises de ausência, mioclônica, atônica, clônica, tônica, e tônico-clônica. Esta são definidas como: ausência – crise com início abrupto e deslocamento de consciência alterado; atônica - perda súbita ou diminuição do tônus muscular sem características precedentes mioclônicas ou tônicas aparente; mioclônica – breves contrações musculares; tônica – aumento do tônus dos membros tipicamente com duração de segundos a um minuto; clônica – envolve espasmos bilaterais rítmicos; tônico-clônica – consiste de uma fase tônica e uma clônica, tipicamente nesta ordem (BERG et al., 2010)

Já as crises epiléticas focais são aquelas em que seu início ocorre dentro de redes neuronais limitadas a um hemisfério. Elas podem ser discretamente localizadas ou mais amplamente distribuídas. Assim como as crises generalizadas as crises focais podem ser originárias de estruturas corticais e subcorticais. Porém de maneira diferente das generalizadas as crises focais apresentam um padrão consistente de uma crise a outra no que se refere ao local de início e áreas recrutadas. Vale ressaltar que um mesmo indivíduo pode apresentar mais de um foco de início de crise, o que leva a crises diferentes dependendo de qual região dispara a crise. Dessa forma as crises focais são descritas de acordo com o grau de comprometimento. Essas podem ser descritas como: focal motora ou autonômica quando apresentam componentes motores e autonômicos observáveis (clonias de um membro, vocalizações, sensações de angústia, orgasmos, eriçamento de pelos) sem o comprometimento da consciência. São descritas também como crises focais discognitivas, na qual se tem o

comprometimento da consciência, ou seja, ocorre o prejuízo da consciência/percepção ou outras características discognitivas. As crises focais podem ainda evoluir para uma crise generalizada levando ao desencadeamento de componentes tônicos, clônicos, tônico-clônicos e prejuízo da consciência (BERG et al., 2010).

A localização e progressão dos eventos ictais são de primordial importância na avaliação de pacientes pois permite diagnóstico diferencial de eventos não epiléticos de crises epiléticas, ensaios randomizados melhor controlados, planejamento mais adequado de cirurgias além de outros aspectos relacionados a esta doença (BERG et al., 2010).

Levando em consideração a causa (etiologia) das crises, elas podem ser classificadas em genética, “estrutural/metabólica”, e “causa desconhecida”, sendo os seguintes conceitos associados:

- Genética: a epilepsia é resultado direto de um defeito genético conhecido ou presumido(s) em que as crises são o principal sintoma da doença. A designação da natureza fundamental do distúrbio como genético não exclui a possibilidade de que fatores do meio ambiente possam contribuir para a expressão da doença. No presente momento, não há virtualmente nenhum conhecimento específico para apoiar as influências ambientais como causas contribuintes a estas formas de epilepsia (SHORVON, 2011).

- “Estrutural/metabólica”: conceitualmente, há uma condição distinta ou estrutural ou metabólica ou outra doença associada a um substancial aumento do risco de desenvolver epilepsia. Lesões estruturais incluem distúrbios adquiridos como acidente vascular cerebral, trauma e infecção. Eles também podem ser de origem genética (por exemplo, esclerose tuberosa, malformações do desenvolvimento cortical); no entanto, como atualmente compreendido, há um distúrbio separado interposto entre o defeito genético e a epilepsia (SHORVON, 2011).

- “Causa desconhecida”: é uma forma neutra para designar que a natureza da causa subjacente é ainda desconhecida; pode haver um defeito genético fundamental, ou pode ser a consequência de um distúrbio separado ainda não reconhecido (SHORVON, 2011).

1.2 Epilepsia do Lobo Temporal

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo de epilepsia mais comum em adultos, caracterizada pela presença de crises focais e com generalização secundária, com início nas estruturas límbicas, as quais incluem o hipocampo e o giro denteado (SUTULA et al., 1998), que acometem cerca de 40% de todos os casos (CENDES, 2005). Esse tipo de epilepsia é uma das formas mais comuns de epilepsia focal, que está associada com trauma craniano, malformações cerebrais, infecções e crises febris (WIEBE, 2000). Atualmente a ELT é subdividida em critérios que se baseiam na origem e semiologia das crises, classificada como mesial ou neocortical (lateral) (ENGEL, 2001). Dentre essas a epilepsia do lobo temporal mesial é a mais comum abrangendo cerca de 60% de todos os casos de ELT (ENGEL, 1992; FRENCH et al., 1993), envolvendo principalmente estruturas límbicas como o córtex entorrinal, neocórtex temporal lateral, tálamo medial, lobo frontal inferior, amígdala e hipocampo (SPENCER, 2002). É caracterizada por seu perfil clínico conhecido, onde a primeira crise surge no final da infância ou no início da adolescência, além da ocorrência de crises focais motora ou autonômica ou discognitiva e crises com generalizações secundárias menos frequentes (CENDES; KOBAYASHI, 2000).

Cerca de 75% dos pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial são considerados como tendo epilepsia resistente a fármacos (SCHMIDT; LOSCHER, 2005). Logo, a importância clínica da ELT deve-se tanto à sua alta prevalência quanto a elevada proporção de pacientes que não respondem aos diferentes esquemas terapêuticos, e por apresentar bom prognóstico com o tratamento cirúrgico, com 80% a 90% de probabilidade de controle de crises (PAGLIOLI-NETO; CENDES, 2000).

O tratamento padrão para pacientes com ELT intratável é a cirurgia, e a operação mais comum realizada para adultos com esclerose hipocampal é a ressecção do lobo temporal anterior com a remoção da amígdala, hipocampo e giro para-hipocampal (THOM et al., 2010).

As características histopatológicas comuns nos cérebros de pacientes afetados por ELT são a esclerose de endfolium, ou seja, a perda de neurônios, no hilo do giro dentado, esclerose do Corno de Amom (CA), ou seja, grave perda de neurônios piramidais (as principais células hipocampais) (Figura 1), e gliose em CA1, no prosubiculum e, de forma menos consistente, em CA3b (MATHERN; BABB;

ARMSTRONG,

1997).

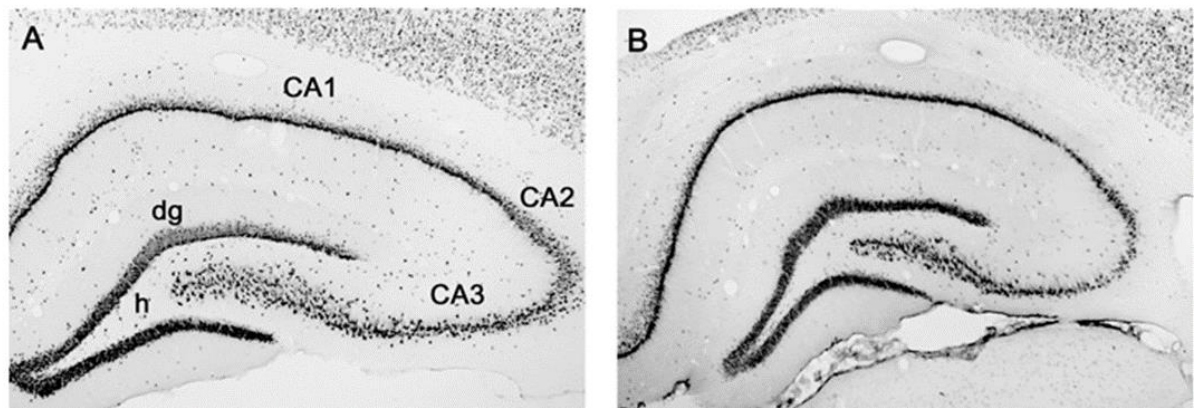


Figura 1. Representação esclerose de endfolium e do Corno de Amom. Sloviter et al. *Epilepsia*. 2007

Geralmente na ELT um hipocampo é mais danificado do que o outro; assim, os danos do hipocampo associado com ELT é frequentemente bilateral, mas assimétricos (JEONG et al., 2005). Menos frequentemente, pode haver lesões do córtex entorrinal e amígdala em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial (YOON et al., 2003).

1.3 Modelo da pilocarpina

A utilização do tecido humano, para o esclarecimento dos mecanismos básicos que envolvem a epileptogênese é difícil. Dentre os vários problemas identificados existem questões éticas, reprodutibilidade, efeitos da própria medicação e aplicações de intervenções experimentais necessárias para a dissecação dos vários processos celulares e sinápticos que contribuem para a atividade epiléptica. Os modelos experimentais de epilepsia denominados agudos, ocorre quando estes são utilizados de maneira em que o animal submetido ao modelo em questão apresenta crises convulsivas apenas durante a vigência do agente indutor, como por exemplo os modelos fármacos convulsivantes (penicilina, estriçnina, oubaína, estrógenos conjugados, ácido quinolónico) e estimulação elétrica focal. Os modelos crônicos de epilepsia são caracterizados por crises recorrentes em intervalos de tempo, não sendo necessário a aplicação do estímulo indutor da epileptogênese para que a crise seja desencadeada, como por exemplo os modelos da pilocarpina e do ácido caínico (AVANZINI et al., 1997).

Uma vez que as epilepsias humanas apresentam crises recorrentes e na maioria das vezes ocorrem de forma espontânea, alguns modelos crônicos de epilepsia se revestem de maior importância por mimetizarem mais adequadamente a condição humana, servindo, portanto, para maior caracterização fisiopatológica e para avaliação de drogas antiepilépticas (LEITE; BORTOLOTTI; CAVALHEIRO, 1990; BLÜMCKE et al., 1999). Dentre esses modelos, o da pilocarpina (PILO) tem sido amplamente usado em função da facilidade técnica e, principalmente, pela semelhança fisiopatológica com a epilepsia do lobo temporal em seres humanos (CAVALHEIRO, 1995).

A pilocarpina é oriunda das plantas sul-americanas *Pilocarpus jaborandi*, e *Pilocarpus microphyllus*, a PILO induz um estado comportamental crônico que se assemelha a epilepsia do lobo temporal humana, e que parece depender da facilitação de descargas em salva em neurônios hipocâmpais por meio do bloqueio de correntes iônicas de potássio, que é dependente da ativação colinérgica muscarínica (SANABRIA; CAVALHEIRO, 2000).

O modelo experimental da epilepsia do lobo temporal através da injeção sistêmica de pilocarpina, que é um agonista colinérgico muscarínico, foi primeiramente descrito por Turski et al (1983). O seguimento temporal do modelo da pilocarpina permitiu dividi-lo em três fases: período agudo, no qual os animais apresentam as crises límbicas evoluindo para estado de mal epilético; período silencioso, com duração em torno de 4 a 44 dias (média de 14,8 dias e mediana de 10 dias), caracterizado pela ausência de sinais comportamentais e eletrográficos de atividade epilética; e período crônico, que se inicia com a primeira crise espontânea que ocorre durante toda a vida do animal. Essas crises espontâneas se iniciam com automatismos faciais, clonias dos membros anteriores, elevação do corpo com apoio nas patas posteriores e perda do equilíbrio seguida por crise clônica generalizada, com duração aproximada de 40 a 60 segundos (CAVALHEIRO et al., 1991). Do ponto de vista estrutural, o hipocampo é a região cerebral mais sensível aos efeitos neuropatológicos desencadeados pela ação epileptiforme resultante da ativação colinérgica (CAVALHEIRO, 1995; MELLO et al., 1993).

A capacidade da pilocarpina de induzir o estado de mal epilético, que é uma condição caracterizada por uma crise epilética que está suficientemente prolongada ou repetida em intervalos suficientemente curtos, de modo a produzir um estado

epiléptico invariável e duradouro (GASTAUT, 1973; ROGER; LOB; TASSINARI, 1974), depende da ativação do receptor muscarínico subtipo M1 (HAMILTON et al., 1997). Outros colinomiméticos, tais como carbacol e oxotremorina, também são capazes de induzir crises e danos cerebrais induzidos por crises quando injetados sistemicamente ou diretamente no cérebro (OLNEY; GUBAREFF; LABRUYERE, 1983; TURSKI et al., 1983b). Além disso, a ocorrência do estado de mal epilético induzido pela pilocarpina pode ser bloqueado pela administração sistêmica de um antagonista muscarínico, como a atropina (CLIFFORD et al., 1987).

Experimentos de cultura de neurônios do hipocampo demonstraram que a pilocarpina, agindo através de receptores muscarínicos, provoca um desequilíbrio entre as transmissões excitatórias e inibitórias, resultando na geração do estado de mal epilético (PRIEL; ALBUQUERQUE, 2002). Além disso, estudos *in vivo* revelaram que a pilocarpina induz uma elevação dos níveis de glutamato no hipocampo e na sequência ocorre o aparecimento de crises (SMOLDERS et al., 1997). Evidências substanciais oferecem suporte para a sugestão de que, após o início por receptores M1, as crises são mantidas pela ativação do receptor NMDA (N-metil D-Aspartato) (NAGAO; ALONSO; AVOLI, 1996; SMOLDERS et al., 1997). A reorganização da rede neuronal nos animais tratados com pilocarpina ocorre provavelmente como consequência da perda neuronal e do brotamento induzido pelo estado de mal epilético (LEHMANN et al., 2001). Esse brotamento é uma das possíveis causas de excitabilidade na ELT (KOYAMA; IKEGAYA, 2004). As células emitem colaterais estabelecendo novas conexões sinápticas aberrantes gerando um rearranjo sináptico dos pacientes com ELT. Esta condição foi inicialmente descrita no giro dentado tanto em humanos quanto em animais epiléticos. Além disso, as fibras musgosas do giro dentado emitem colaterais para seu próprio campo dendrítico, resultando em um circuito excitatório recorrente (AVOLI et al., 2002). Esta característica não se restringe ao giro dentado, mas também para CA1 e outras e outras áreas extra hipocámpais contribuindo para a cronicidade das crises

1.4 Morte súbita e inesperada nas epilepsias (SUDEP)

Estudos mostram que as crises são controladas com sucesso com drogas antiepilépticas atualmente em cerca de dois terços dos pacientes com epilepsia, o que resulta em um terço com epilepsia refratária (LAXER et al., 2014; BANERJEE et al., 2009; FORSGREN et al, 2005; SANDER, 2003; KWAN; SANDER, 2004). Para estes pacientes com crises não controladas, a epilepsia deve ser considerada como uma condição maligna, uma vez que pacientes com epilepsia possuem uma taxa de mortalidade de 2 a 3 vezes maior do que a população em geral (GAITATZIS; SANDER, 2004). De fato, a morte súbita e inesperada nas epilepsias (SUDEP, do inglês *sudden unexpected death in epilepsy*) é a causa mais frequente de morte relacionada à esta doença. Por definição, SUDEP é uma morte súbita, inesperada, testemunhada ou não testemunhada, não-traumática e sem afogamento em indivíduos com epilepsia, com ou sem evidência de crises (exceto estado de mal epilético), nas quais o exame *post-mortem* não revela causa toxicológica ou anatômica para a morte (GAITATZIS; SANDER, 2004; NASHEF; RYVLIN, 2009; NEI; HAYS, 2010; HESDORFFER et al. 2011).

Estudos epidemiológicos indicam que a SUDEP é responsável por 7,5% a 17% de todas as mortes na epilepsia e tem uma incidência entre adultos entre 1:500 e 1:1000 paciente/ano (SCHUELE et al. 2007). Os principais fatores de risco para SUDEP incluem o número de crises tônico-clônicas generalizadas, crises noturnas, início precoce da epilepsia, a longa duração da epilepsia, demência, ausência de doença cerebrovascular, asma, sexo masculino, etiologia sintomática da epilepsia e abuso de álcool (HESDORFFER et al. 2011; HESDORFFER; TOMSON, 2003). A causa ou causas da SUDEP ainda são desconhecidas, entretanto, é muito provável que arritmias cardíacas durante, após e entre as crises convulsivas, distúrbios eletrolíticos, uso de drogas arritmogênicas ou transmissão da atividade epilética para o coração via sistema nervoso autônomo potencialmente podem estar envolvidos neste processo (STOLLBERGER; FINSTERER, 2004; RYVLIN et al., 2006). De acordo com Leutmezer et al. (2003), as crises convulsivas estão associadas com várias mudanças nas funções autonômicas, as quais podem levar a manifestações cardiovasculares, respiratórias, gastrintestinais, cutâneas, urinárias ou sexuais durante ou logo após o episódio convulsivo. Nesse sentido, um dos principais mecanismos propostos está relacionado à prejuízos autonômicos, promovendo

alterações cardíacas e/ou respiratórias durante e entre as crises (SURGES et al. 2010; COLUGNATI et al. 2005; PANSANI et al. 2010).

1.5 Alterações cardiovasculares na epilepsia

O interesse em distúrbios cardíacos e seu papel etiológico no contexto da morte súbita tem crescido bastante (NEI, 2009; SURGES et al., 2010). Estudos clínicos e experimentais mostram no coração e em traçados eletrocardiográficos de indivíduos com epilepsia sinais típicos de isquemia miocárdica e distúrbios eletrolíticos, que são fatores que classicamente predispõem o coração a arritmias além de alterações de modulação autonômica tanto interictais quanto ictais que favorecem para o mesmo fim (Surges et al., 2009; STÖLLBERGER; FINSTERER, 2004; SURGES et al. 2010; NEI et al., 2004). Os efeitos cardíacos da epilepsia são comuns e vão desde mudanças sutis na variabilidade da frequência cardíaca (VFC) para parada sinusal ictal, e do encurtamento e alargamento do intervalo QT para fibrilação atrial (DEVINSKY, 2004; TOMSON; NASHEF; RYVLIN, 2008). Diversos trabalhos sugerem que as mudanças na variabilidade da frequência cardíaca na epilepsia resulta das alterações autonômicas interictais, bem como das próprias descargas autonômicas que ocorrem durante as crises (SEVCENCU; STRUIJK, 2010).

Estudos de variabilidade da frequência cardíaca mostram que pacientes com epilepsia do lobo temporal podem ter respostas autonômicas anormais no período interictal (TOMSON et al., 1998; RONKAINEN et al., 2005), uma vez que a VFC reflete o equilíbrio entre os sistemas nervoso simpático e parassimpático, apresentando redução do tônus vagal cardíaco. Stein e Kleiger (1999) relataram que a diminuição da VFC está associada a maior mortalidade e aumento da incidência de morte súbita cardíaca, seja esta alteração associada ou não com doença cardíaca preexistente, o que pode contribuir para a morte súbita ocorre frequentemente durante o sono (DRUSCHKY et al., 2001) em pessoas com epilepsia, já que a variabilidade da

frequência cardíaca destes pacientes aparece particularmente reduzida durante a noite (TOMSON et al., 1998; RONKAINEN et al., 2005). De forma interessante a taquicardia ictal, ou seja, taquicardia durante as crises, é considerada uma das alterações cardíacas mais frequentes (SEVCENCU; STRUIJK, 2010; DEVINSKY, 2004), podendo, inclusive, preceder o início de mudanças ictais no eletroencefalograma em até 87% das crises (NEI et al., 2004; SEVCENCU; STRUIJK, 2010; LEUTMEZER et al., 2003; NOVAK et al., 1999; BLUMHARDT; SMITH; OWEN, 1986; VELAGAPUDI et al., 2012) ou não ser um fato precedente e surgir apenas após o início das crises epiléticas (SEVCENCU; STRUIJK, 2010; GARCIA et al., 2001).

Blumhardt et al. (1989) relataram que 92% dos 26 pacientes com crises do lobo temporal com registros de EEG-ECG (eletroencefalocardiograma), por monitorização ambulatorial, apresentaram aumento na frequência cardíaca. Keilson et al. (1989) relataram que 93% de 106 crises lateralizadas e generalizadas (em 45 pacientes submetidos a 24 horas de monitorização ambulatorial do EEG- ECG), com uma duração de pelo menos 30 segundos, foram associados com taquicardia ictal superior a 100 batimentos por minuto. Estes ainda mostraram que a taquicardia não estava relacionada com o hemisfério de início da crise.

Colugnati et al. (2005) avaliaram a frequência cardíaca em ratos com epilepsia *in vivo* e *ex vivo* na preparação de coração isolado (preparação de Langendorff). A frequência cardíaca basal em animais com epilepsia crônica (346 ± 7 bpm) foi maior do que nos ratos controle (307 ± 9 bpm) somente na condição *in vivo*, sugerindo que a modulação autonômica do coração é alterada em animais com epilepsia, explicando a manutenção de um aumento na frequência cardíaca basal nestes animais.

Em contrapartida, assistolia e bradicardia relacionadas com as crises são muito menos comuns, porém mais relacionadas à SUDEP. Numa análise retrospectiva, apenas 5 de 1244 pacientes submetidos ao monitoramento de EEG por vídeo tiveram assistolia ictal (ROCAMORA et al., 2003). Schuele et al. (2007) também observaram que assistolia ictal é rara, observada em apenas 0,27% dos 6825 pacientes que foram submetidos ao monitoramento de EEG por vídeo.

Além de alterações da frequência cardíaca as crises também podem causar anomalias de condução. Keilson et al. 1987 observaram que entre os 17 pacientes nos quais foram registradas 56 crises eletrográficas de mais de 10 segundos, não há

anormalidades ectópicas ou de condução no ventrículo. No entanto, os pacientes com epilepsia refratária parecem ter um risco maior de anormalidades no ritmo e condução cardíacos relacionados com as crises. Em outro estudo, trinta e nove por cento dos 43 pacientes com epilepsia focal refratária tiveram anormalidades no ritmo e/ou repolarização cardíacas durante ou imediatamente após crises observadas no registro de EEG por vídeo. Estas anomalias incluem fibrilação atrial, taquicardia supraventricular, bloqueio de ramo, extra-sístoles atriais, extra-sístoles ventriculares, elevação do segmento ST, e assistolia (NEI; HO; SPERLING, 2000). Anormalidades potencialmente graves, incluindo o ritmo de escape juncional, fibrilação atrial, elevação do segmento ST, e assistolia, foram vistos em 14% dos indivíduos, por Nei (2009). Tigarán et al. (2003) relataram que 40% dos pacientes com epilepsia focal refratária apresentaram infra desnivelamento do segmento ST relacionada com a crise, sugerindo que a isquemia cardíaca pode ocorrer durante as crises. Este indicativo de isquemia miocárdica associada à taquicardia ictal é consistente com relatos sobre inversão de onda T durante a taquicardia ictal (NEI et al., 2000; OPPERK et al., 2002).

Do ponto de vista morfológico, alterações cardiovasculares têm sido demonstradas em pacientes com epilepsia que morreram subitamente. Os trabalhos nessa linha de investigação tiveram início na década de 70 e se estendem até os dias atuais. Quando necropsiado, o tecido cardíaco de pacientes com epilepsia apresenta alterações micro e macroscópicas que podem contribuir para a SUDEP, tais como: dilatação e hipertrofia cardíaca, fibrose nas paredes de pequenas artérias coronárias, atrofia dos cardiomiócitos, degeneração miofibrilar, infiltração leucocitária que sugere miocardite focal e alterações morfológicas do sistema de condução cardíaco (KLOSTER; ENGELSKJON, 1999; FALCONER; RAJS, 1976; ANTONIUK et al., 2001; NATELSON et al., 1998; OPESKIN; THOMAS; BERKPVIC, 2000). Especula-se também que as alterações em eletrólitos e pH do sangue, juntamente com a liberação de catecolaminas pode facilitar arritmias (SURGES et al., 2009).

Já foi relatado que os pesos dos corações estão aumentados na SUDEP (LEESTMA, 1990) e sugeriu-se que uma sutil patologia cardíaca pode contribuir para a SUDEP. Assim a SUDEP pode estar associada com cardiopatias sutis alterações anatômicas no sistema de condução, áreas focais de fibrose do miocárdio ou doença arterial coronariana semelhante a sutis achados patológicos encontrados em jovens

vítimas de morte súbita cardíaca sem epilepsia (HAEREM, 1978; LEESTMA et al., 1989). Um estudo mostrou que os corações de algumas vítimas de SUDEP apresentavam fibrose perivascular e intersticial, que foram considerados pelos autores um resultado do dano cardíaco anterior devido a convulsões e podem ser responsáveis pela SUDEP (NATELSON et al., 1998). A presença do ateroma da artéria coronária tem sido relatado, em algumas SUDEPs (LEESTMA et al., 1989) mas a importância disto é incerta (BROWN, 1992).

1.6 Morte Súbita Cardíaca (MSC) e Doença Arterial Coronariana (DAC)

A morte súbita cardíaca é definida como morte devido a qualquer doença cardíaca, que ocorre fora do hospital, num departamento de emergência, ou quando o indivíduo é declarado morto à chegada ao hospital. A morte terá que ter ocorrido dentro de uma hora após o início dos sintomas (JEFFREY et al., 2008). Este tipo de morte é responsável por mais de 50% de mortes por doença cardiovascular (REA; PAGE, 2010). Uma das suas principais causas é a doença coronária que é responsável por mais de 80% destas mortes (ARZAMENDI et al., 2011).

Os diferentes mecanismos de MSC podem ser agrupados em dois grandes grupos. Um “mecânico” e outro “elétrico”. O “mecânico” ocorre quando a função de bomba do coração é afetada por um bloqueio agudo da circulação sanguínea. Por outro lado, e na grande maioria dos casos (90%), a causa da MSC é de origem arritmica (elétrica) (THIENE et al., 2010).

As principais causas responsáveis pela morte súbita são as causas cardiovasculares, destacando-se de longe a doença coronária sendo a principal causa deste tipo de acontecimento em indivíduos com mais de 35 anos de idade, sendo mais comum em homens, uma vez que as mulheres estão protegidas durante a idade fértil devido aos estrogénios (WINKEL et al., 2011). Estas mortes podem dever-se a isquemia aguda ou a cicatrizes propiciadoras de circuitos de reentrada e arritmias ventriculares fatais. Há também fatores genéticos que alteram a resposta de certos indivíduos a certas agressões e que os tornam mais sensíveis à doença arterial coronária (NAIK; YADAV, 2010).

As artérias coronárias também podem apresentar origens anômalas o que pode condicionar diminuição do fluxo coronário e isquemia aguda do miocárdio. Esta é também uma causa de MS em adolescentes e jovens adultos (<35 anos) (VIRMANI; BURKE; FARB, 2001).

1.7 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e estresse oxidativo na DAC

Sob condições fisiológicas normais, a maioria das ERO é produzida na cadeia respiratória mitocondrial, onde de 2% a 5% dos elétrons são desviados para a produção de radicais livres (RL). Adicionalmente, as ERO podem ser geradas em outros eventos bioquímicos na célula, como, por exemplo, em processos inflamatórios, no catabolismo de ácidos graxos, na degradação da xantina a ácido úrico e auto-oxidação de catecolaminas. Embora esses processos sejam normais para a vida das células, a produção excessiva de ERO pode provocar danos a biomoléculas (como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios) os quais, em grande extensão, podem levar à morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A produção de RL nem sempre é prejudicial ao organismo, pelo contrário, é necessária em vários processos biológicos, como sinalização celular, contração muscular e sistema imune. O grande problema é que, quando os níveis totais gerados de RL forem maiores que a capacidade de defesa, podem ocorrer danos celulares significativos (MATSUO; KANEKO, 2001).

O aumento do estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese de doenças cardiovasculares. Estudos clínicos experimentais têm sugerido que essas doenças estão associadas ao aumento da formação de radicais livres e à redução das defesas antioxidantes (SINGH; JIALAL, 2006).

Atualmente, o mais importante mecanismo pelo qual se acredita que o estresse oxidativo altera a função endotelial é a inativação do NO pelos ânions superóxidos e lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLs-ox). Esses RL desativam os receptores endoteliais para acetilcolina, serotonina, trombina, bradicinina e outros mediadores, diminuindo a estimulação da NOS nas células endoteliais e, conseqüentemente, reduzindo a produção de NO, prejudicando o

relaxamento das células musculares lisas e predispondo à formação da placa aterosclerótica (SINGH; JIALAL, 2006).

Neste sentido, até onde sabemos não tem nenhum trabalho que tenha investigado como está o controle do fluxo coronariano de pacientes ou em modelos experimentais de epilepsia. Como as doenças coronarianas figuram como uma das principais causas de morte súbita na população mundial (SCORZA; TUCCI, 2015) acreditamos que este pode ser um potencial fator que se não fundamental possa pelo menos contribuir para a SUDEP.

2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a reatividade coronariana, bem como a função e forma do coração de ratos submetidos ao modelo de epilepsia induzida pela pilocarpina.

2.2 Objetivo Específico

Avaliar a resposta coronariana do coração isolado de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina frente a estímulos com bradicinina e nitroprussiato de sódio;

Avaliar a função ventricular do coração isolado de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina frente a estímulos com bradicinina e nitroprussiato de sódio;

Avaliar a expressão da óxido nítrico sintase endotelial total em coronárias do coração isolado de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.

Avaliar o estresse oxidativo, através da expressão das enzimas superóxido dismutase e catalase de coronárias de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina;

Avaliar a revascularização coronariana de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.

Avaliar remodelamento cardíaco por meio de análise de colágeno e de hipertrofia cardíaca.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados 16 ratos, da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 300g no início dos experimentos, estes foram separados em 2 grupos: grupo controle (n=8) e grupo epilepsia (n=8). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás e confinados no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Os animais ficaram alocados em grupos de cinco, no início do experimento, em gaiolas apropriadas, onde tiveram livre acesso à comida e água. As condições do biotério obedecem a um ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo a temperatura ambiente mantida constante entre $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA; protocolo: 025/2012).

3.2 Indução do modelo de epilepsia pela pilocarpina

Para obtenção dos animais com epilepsia (período crônico) foi utilizado o modelo da pilocarpina. No desenvolvimento deste modelo foi utilizada a dose de 340 mg/kg de pilocarpina para todos os animais. Esta droga foi injetada intraperitonealmente e os seus efeitos foram observados e classificados segundo a metodologia descrita por Turski e colaboradores (TURSKI et al., 1983).

Todos os animais foram pré-tratados subcutaneamente com metil-escopolamina (1 mg/kg), 30 minutos antes da injeção de pilocarpina, afim de atenuar os efeitos periféricos provocados por esta droga.

Depois que os animais entraram em estado de mal epilético permaneceram neste estado por 3 horas, ao passo que após este período injetou-se, intraperitonealmente, diazepam (10 mg/kg), para bloqueio do estado de mal epilético, e logo após foram hidratados com salina isotônica subcutaneamente, e

posteriormente alocados em gaiolas com no máximo dois animais e levados para a sala de vídeo (Figura 2).

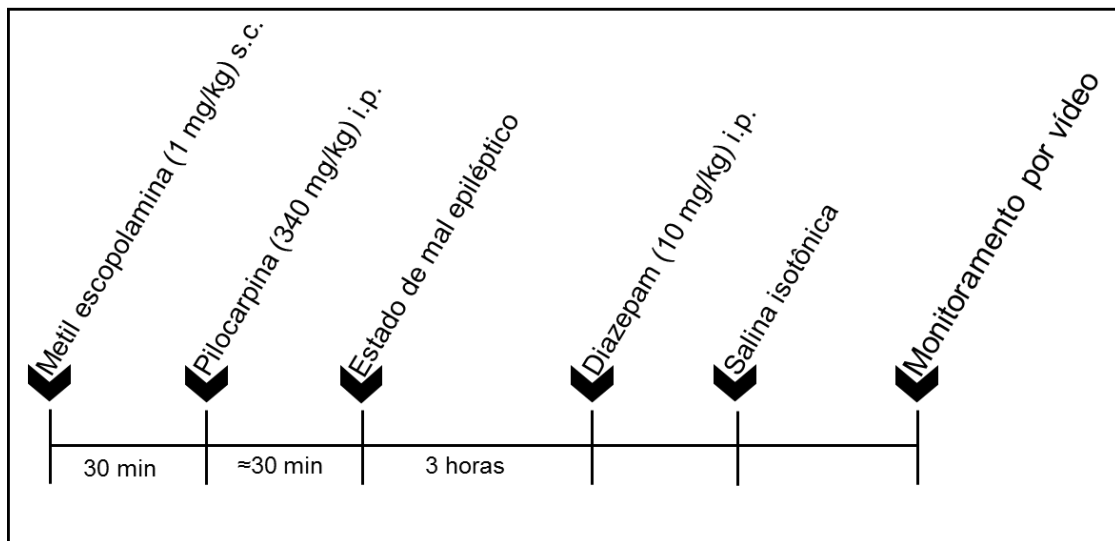


Figura 2. Protocolo de indução de epilepsia pela pilocarpina.

3.3 Monitoramento por vídeo (confirmação do período crônico)

Os animais permaneceram na sala de monitoramento por vídeo, sendo que esse foi feito 24h/dia. Assim, através das filmagens obtidas foi possível observar quando o animal apresentou a primeira crise espontânea, confirmando o período crônico. Esse monitoramento também permitiu a verificação da frequência de crises e suas durações.

3.3.1 Grupos experimentais:

Os animais foram separados em dois grupos:

1. Grupo controle:

Os animais desse grupo foram submetidos a todos os procedimentos envolvidos na indução do modelo da pilocarpina (TURSKI et al., 1983), porém esses animais não entraram em estado de mal epiléptico.

2. Grupo epilepsia:

Compõe esse grupo os animais que foram submetidos ao modelo de indução de epilepsia pela pilocarpina, como citado acima, entraram em estado de mal epilético, e apresentaram posteriormente crises espontâneas.

3.4 Preparo do coração isolado

Após dois meses de epilepsia os animais, tanto do grupo controle quanto o grupo epilepsia, que apresentavam idade média de seis meses, foram submetidos a eutanásia por decapitação após 10 minutos da administração de heparina (400 UI, i.p). O tórax foi aberto e o coração retirado e colocado em um béquer contendo solução nutritora em temperatura aproximada de 4°C. Esse resfriamento foi necessário para diminuir o metabolismo do miocárdio, antes destes serem conectados ao sistema de perfusão.

Após os corações terem sido colocados sobre uma placa de Petri, foram removidos os tecidos pulmonar e vascular, esôfago e traqueia que acompanharam o coração, a artéria aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação e fixada a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema Langendorff de perfusão (Figura 3) contendo a solução nutritora de Krebs-Ringer descrita na Tabela 1. A solução de perfusão foi mantida a 37 ± 1 °C e saturada com solução carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂).

Tabela 1. Composição da solução de Krebs-Ringer

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO EM mM
NaCl	118,41
KCl	4,69
KH ₂ PO ₄	1,17
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,17
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25
Dextrose Anidra (Glicose)	11,65
NaHCO ₃	26,24

O coração foi perfundido em fluxo constante e um transdutor de pressão (MLT0699 Adinstruments®) foi conectado à via de perfusão para registro de variações da pressão de perfusão mediante a reatividade das coronárias. Um balão, preenchido com água e conectado a um transdutor de pressão (MLT0699 Adinstruments®), foi introduzido no ventrículo esquerdo através de uma incisura no átrio esquerdo, para a medição da pressão ventricular.

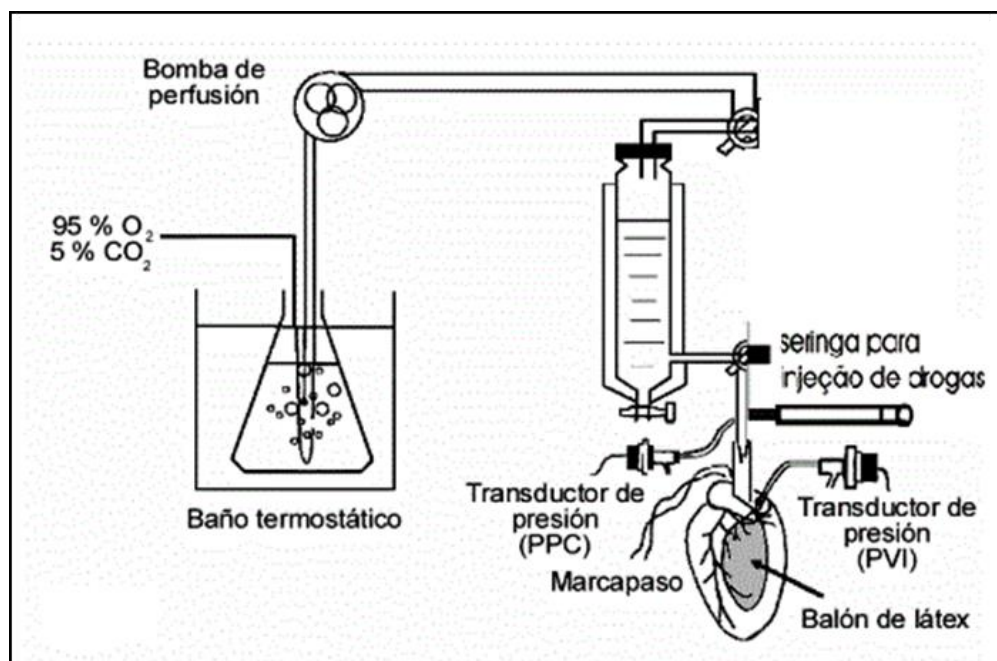


Figura 3. Preparação de Langendorff modificada. Aadaptado de: fac.org.ar/scvc/llave/tlibres/tl060/tl060i.htm.

Ambos os grupos foram submetidos ao mesmo protocolo: após um período de aproximadamente 35 minutos de estabilização o coração primeiramente foi perfundido com o veículo (apenas solução Krebs-Ringer) em bolus, depois perfundido com bradicinina (BK) em bolus nas concentrações 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M, para testar a reatividade coronariana dependente do endotélio, e depois novamente com veículo, seguido de nitroprussiato de sódio (NPS), também em bolus, nas concentrações 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M (Figura 4), para testar reatividade coronariana independente do endotélio. Foram monitorados durante todo o tempo os parâmetros de pressão intraventricular sistólica (PIS), pressão intraventricular diastólica (PID), e pressão de perfusão (PP). Os sinais obtidos foram enviados ao sistema de aquisição e análise de dados (MP100, Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, EUA). Depois, a partir do programa LabChart 7 (ADInstruments), foi possível obter

frequência cardíaca (FC) e as derivadas ($dP/dt +$, $dP/dt -$), que foram calculadas a partir do registro de pressão intraventricular.

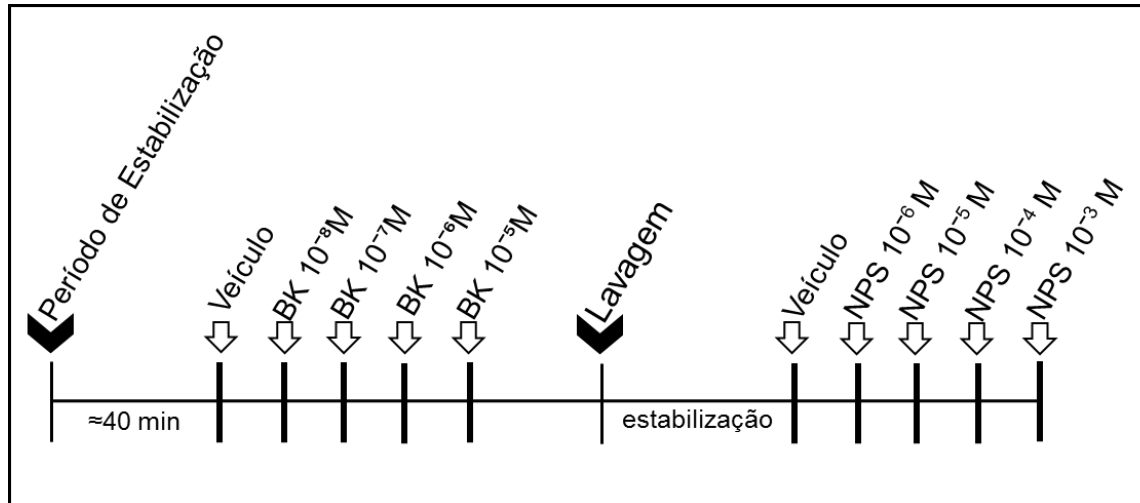


Figura 4. Protocolo de avaliação da reatividade coronariana no coração isolado, com infusão de bradicinina (BK) e nitroprussiato de sódio (NPS).

3.5 Índice de hipertrofia

Após o protocolo de coração isolado, perfundiu-se o coração com KCl 4 mM, para o relaxamento total das fibras, em seguida foi feita a retirada completa dos átrios esquerdo e direito, e os ventrículos foram então pesados. Fez-se também a retirada e medida da tíbia do animal com o auxílio de um paquímetro, assim foi possível fazer a relação entre o peso dos ventrículos pelo comprimento da tíbia do animal para obtenção do índice de hipertrofia.

3.6 Análise Histológica

Para preparar o material para todas as colorações utilizadas, após a retirada dos átrios, foram feitos cortes transversais no coração, obtendo assim a região central com aproximadamente 5 mm, e os segmentos dos ventrículos coletados foram fixados em paraformaldeído 4%, depois incluídos em parafina, e submetidos a cortes histológicos com 5 μ m (micrômetros) de espessura. As colorações nas quais os cortes foram submetidos estão descritas a seguir:

3.6.1 Coloração em hematoxilina e eosina (HE)

Essa coloração foi utilizada para estudo morfométrico e de revascularização cardíaca. Para esta coloração os cortes foram dispostos em lâminas não silanizadas. A técnica utilizada para corar os cortes com HE seguiu o seguinte protocolo:

1. Desparafinização: 3 banhos em xilol, 20 minutos cada à temperatura ambiente (TA);
2. Hidratação:
 - álcool etílico absoluto I (1 minuto) TA;
 - álcool etílico absoluto II (1 minuto) TA;
 - álcool etílico absoluto III (1 minuto) TA;
 - álcool etílico 70% (1 minuto) TA;
 - álcool etílico 50% (1 minuto) TA;
3. Lavagem das lâminas: água corrente (5 minutos);
4. Solução de Hematoxilina (5 minutos) TA;
5. Lavagem das lâminas (10 minutos) TA;
6. Álcool etílico 80% (1 minuto) TA
7. Solução de eosina (4 minutos) TA;
8. Lavagem das lâminas: lavados rapidamente com álcool 95% TA;
9. Desidratação:
 - álcool etílico 95% (1 minuto) TA;
 - álcool etílico absoluto I (1 minuto) TA;
 - álcool etílico absoluto II (1 minuto) TA;
 - álcool etílico absoluto III (1 minuto) TA;
10. Desidratação: 3 banhos em xilol, 20 minutos cada TA;
11. Montagem das lâminas

Para o estudo morfométrico foram analisados 200 cardiomiócitos por grupo. Somente cardiomiócitos dispostos longitudinalmente com núcleo e limites celulares visíveis foram analisados, obtendo-se a medida da Área de Secção Transversa (AST).

A análise de revascularização cardíaca foi feita quantificando as artérias presentes no ventrículo esquerdo das lâminas analisadas.

Para análise da coloração as imagens foram obtidas no microscópio Zeiss Scope A1, sendo que as imagens foram capturadas sob luz convencional em magnitude de 20x. Posteriormente foram digitalizadas no software Zen Lite 2012 e analisadas no software Image Pro-Plus v6.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA).

3.6.2 Coloração em picrosírius

A análise na coloração em picrosírius foi feita em lâminas não silanizadas, com o seguinte protocolo:

1. Desparafinização: 3 banhos em xilol, 20 minutos cada TA;
2. Hidratação:
 - álcool etílico absoluto I (1 minuto) TA;
 - álcool etílico absoluto II (1 minuto) TA;
 - álcool etílico 70% (1 minuto) TA;
 - álcool etílico 50% (1 minuto) TA;
3. Lavagem das lâminas: água corrente (2 minutos);
4. Solução picrosírius (1 hora) TA;
5. Lavagem rápida das lâminas
6. Solução de hematoxilina (8 minutos) TA;
7. Lavagem das lâminas: água corrente (10 minutos);

8. Desidratação:

- álcool etílico 95% (1 minuto) TA;
- álcool etílico absoluto I (1 minuto) TA;
- álcool etílico absoluto II (1 minuto) TA;
- álcool etílico absoluto III (1 minuto) TA;

9. Desidratação: 3 banhos em xilol, 20 minutos cada TA;

10. Montagem das lâminas

Para análise da coloração as imagens foram obtidas no microscópio Zeiss Scope A1, sendo que as imagens foram capturadas sob luz convencional em magnitude de 20x. Posteriormente foram digitalizadas no software Zen Lite 2012 e analisadas no software Image Pro-Plus v6.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA).

3.6.3 Marcação para estudo imuno-histoquímico

Este método foi utilizado para análise de eNOS, catalase, e superóxido dismutase cobre-zinco (SOD-1). Para isso foi utilizado o kit de imuno-histoquímica Novolink Polymer Detection System da Leica biosystems, e os cortes foram anteriormente dispostos em lâminas de vidro silanizadas, com o seguinte protocolo:

1. Desparafinização: 3 banhos em xilol, 20 minutos cada TA;

2. Hidratação:

- álcool etílico absoluto I (1 minuto) TA;
- álcool etílico absoluto II (1 minuto) TA;
- álcool etílico absoluto III (1 minuto) TA;
- álcool etílico 95% (1 minuto) TA;
- álcool etílico 80% (1 minuto) TA;

- álcool etílico 70% (1 minuto) TA;
- 3. Lavagem das lâminas (5 minutos) TA;
- 4. Incubação tampão citrato de sódio 10 mM no micro-ondas (3 vezes de 5 minutos);
- 5. Lavados em tampão PBS (do inglês phosphate buffered saline) 10 mM, (3 vezes de 5 minutos) TA;
- 6. Incubação com o bloqueador de peroxidase endógena em uma câmara escura e úmida (5 minutos) TA;
- 7. Incubação com o bloqueador de proteínas inespecíficas (5 minutos) TA;
- 8. Incubação com os anticorpos (Tabela 2) diluídos em solução de BSA (do inglês Bovine Serum Albumin) a 1% em PBS, e deixados na câmara escura e úmida overnight a 4°C;
- 9. Dia seguinte: lavados em tampão PBS, (3 vezes de 5 minutos) TA;
- 10. Incubação com o anticorpo pós-primário (1 hora), 37°C;
- 11. Lavados em tampão PBS, (3 vezes de 5 minutos) TA;
- 12. Incubação com o polímero (1 hora), 37°C;
- 13. Lavados em tampão PBS, (3 vezes de 5 minutos) TA;
- 14. Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Tabela 2);
- 15. Lavagem rápida
- 16. Contra coloração com hematoxilina (45 segundos)
- 17. Desidratação:
 - álcool etílico 70% (1 minuto) TA;
 - álcool etílico 80% (1 minuto) TA;
 - álcool etílico 95% (1 minuto) TA;
 - álcool etílico absoluto I (1 minuto) TA;
 - álcool etílico absoluto II (1 minuto) TA;

- álcool etílico absoluto III (1 minuto) TA;

18. Desidratação: 3 banhos em xilol, 20 minutos cada TA;

19. Montagem das lâminas

Tabela 2. Anticorpos, fabricantes, diluição, e tempo de exposição ao DAB dos anticorpos primários utilizados no estudo imuno-histoquímico.

Anticorpo	Fabricante	Diluição	Tempo DAB (min)
eNOS (49G3)	Cell Signaling technology	1:100	Controle: 7:40 Epilepsia: 10
SOD-1 (FL-154): sc-11407	Santa Cruz Biotechnology, INC	1:100	Controle: 3:00 Epilepsia: 3:14
Catalase	Lifespam Biosciences	1:100	Controle: 2:15 Epilepsia: 1:50

Para análise imuno-histoquímica dos antígenos presentes nos ventrículos direito e esquerdo, o parâmetro constituiu na positividade da marcação, e considerou-se positivas as células que exibiram coloração acastanhada no núcleo ou citoplasma. Após o tratamento imuno-histoquímico, as células imunorreativas foram primeiramente analisadas visualmente, por dois avaliadores com experiência prévia, sendo que os mesmos não conheciam a qual grupo experimental pertencia cada lâmina analisada. A avaliação das lâminas foi realizada de acordo com o seguinte critério: Artérias coronárias em que seu perímetro não apresentava marcação nenhuma para determinado anticorpo, artérias com marcação que abrangia até 50% do perímetro, artérias com marcação abrangendo de 50 a 75% do perímetro total e artérias com mais de 75% do perímetro marcado.

3.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos. A análise de reatividade coronariana, FC, PIS, PID, dP/dt +/-, e Pressão Desenvolvida no ventrículo esquerdo foi feita utilizando-se Two-way ANOVA, pós-teste de Fisher. Para análise dos valores basais, índice de hipertrofia, morfometria, colágeno e revascularização cardíaca, e do colágeno utilizou-se teste t de student. Os dados obtidos da imuno-histoquímica foram analisados pelo modelo de Poisson. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o software Prisma 5.0 (GraphPad, USA) e SigmaPlot 11.0, e os dados estão expressos com média $\pm$ erro padrão da média.

4. RESULTADOS

Os animais que compuseram o grupo com epilepsia neste trabalho apresentaram em média 24 dias de período silencioso, 1,7 crises por semana, e essas tiveram uma média de duração de 37,2 segundos.

Após 2 meses de epilepsia crônica foi realizada a técnica de coração isolado pelo método de Langendorff com fluxo constante utilizando BK e NPS. Os parâmetros basais de PIS, PID, $dP/dt +$, $dP/dt -$, FC, e PP dos corações isolados, ou seja, no momento anterior ao início da infusão de BK não apresentaram diferença significativa quando comparados entre os grupos (Figura 5).

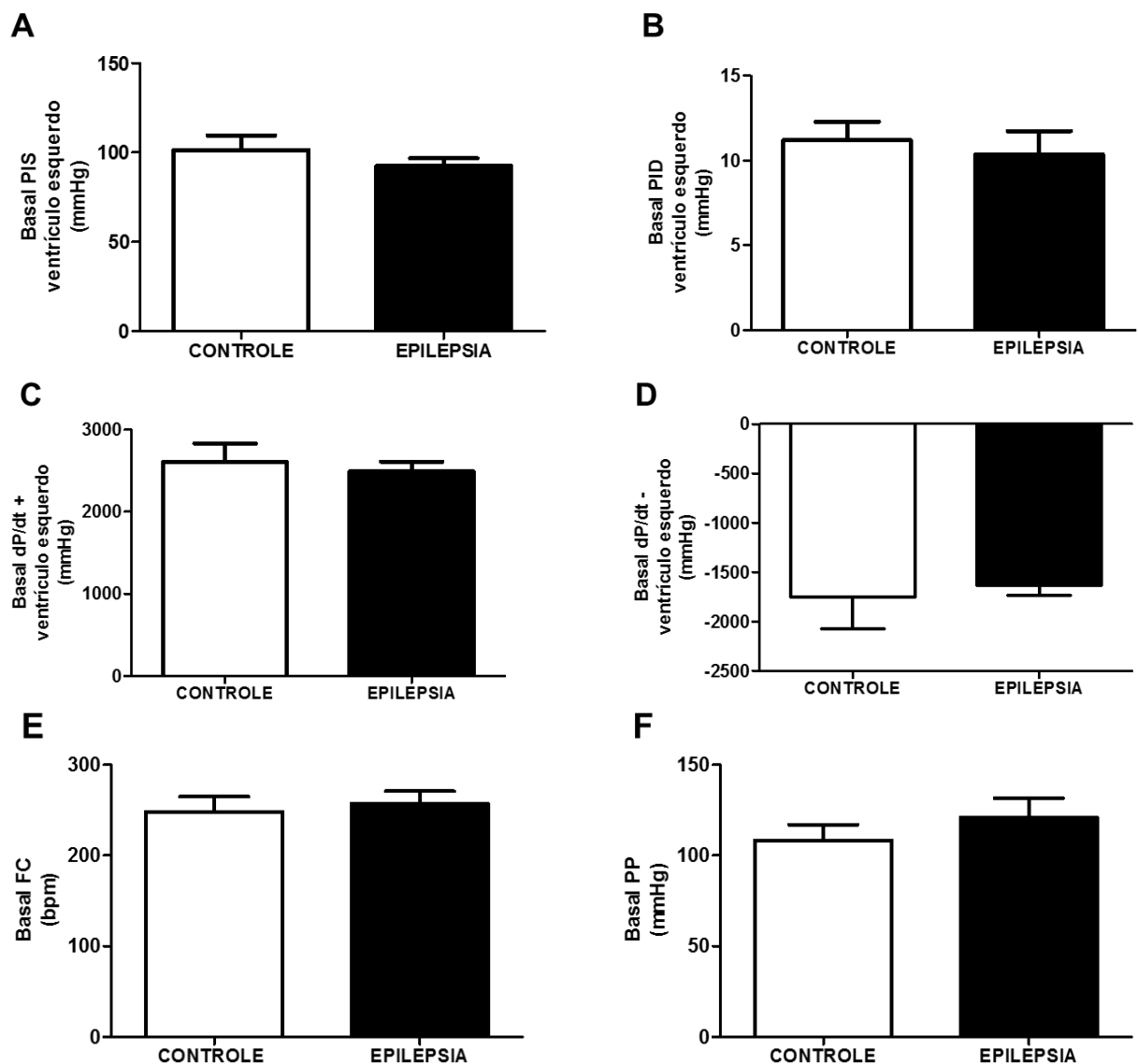


Figura 5. Parâmetros basais, dos grupos controle e epilepsia. (A) Pressão Intraventricular Sistólica (PIS), (B) Pressão Intraventricular Diastólica (PID), (C) $dP/dt +$, (D) $dP/dt -$, (E) Frequência Cardíaca (FC), (F) Pressão de Perfusão (PP). Controle n=8, epilepsia n=8, teste t de student.

Para testar a reatividade coronariana foi analisada a porcentagem de relaxamento coronariano através da queda na pressão de perfusão. Frente ao estímulo em bolus de bradicinina observou-se diferença significativa na concentração 10^{-5} M entre os grupos controle ($-28,02 \pm 2,42$) e epilepsia ($-19,27 \pm 2,86$) (Figura 6A), mostrando que os animais do grupo epilepsia apresentam um menor relaxamento coronariano. Frente ao estímulo com nitroprussiato de sódio, não foram observadas diferenças significativas (Figura 6B).

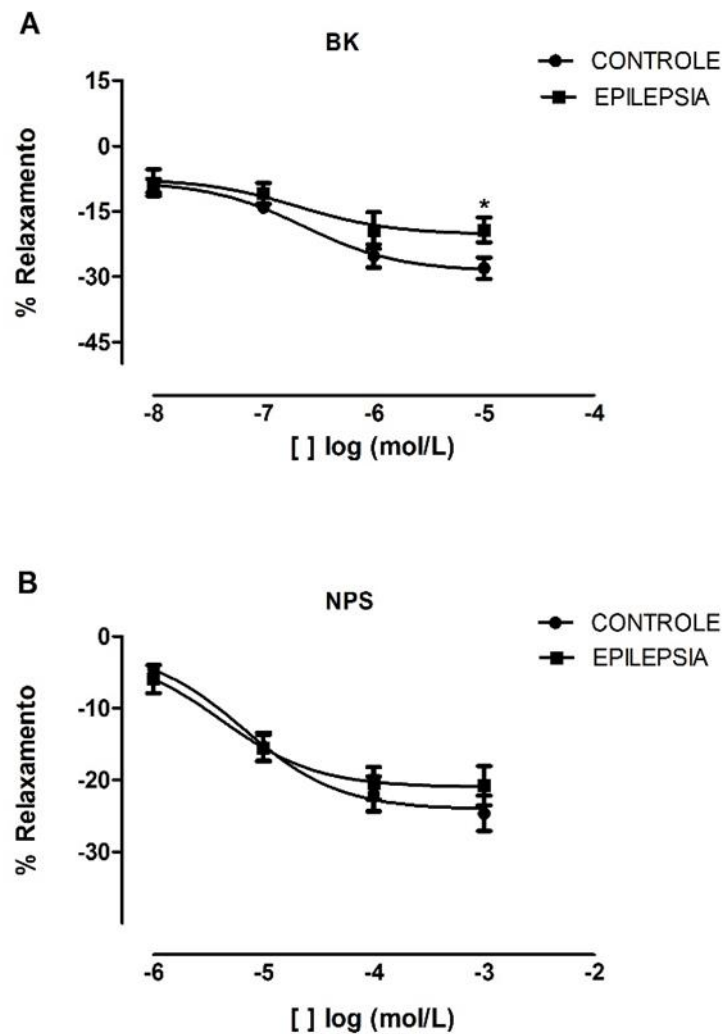


Figura 6. Porcentagem de relaxamento coronariano: (A) induzido por bradicinina (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} M), e (B) induzido por nitroprussiato de sódio (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M), observado na variação de pressão de perfusão dos grupos controle e epilepsia. * Indica diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Controle $n=8$, epilepsia $n=8$, two-way ANOVA, pós-teste de Fisher.

Os resultados de variação de PIS, PID, dP/dt +/-, FC, e Pressão Desenvolvida no ventrículo esquerdo não apresentaram diferença significativa entre os grupos, tanto por infusão de bradicinina (Figura 7), quanto de nitroprussiato de sódio (Figura 8).

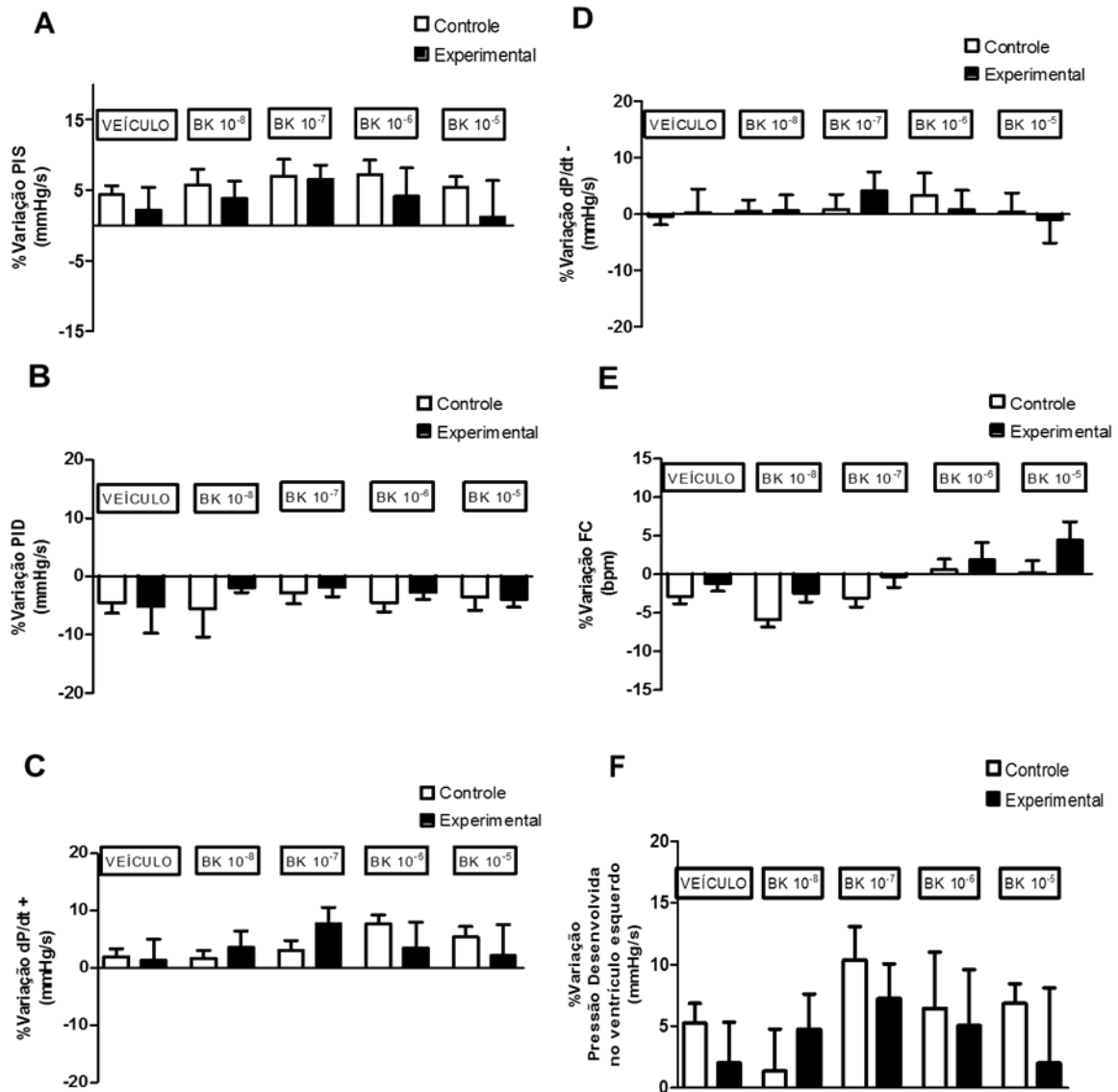


Figura 7. Porcentagem de variação de: (A) Pressão Intraventricular Sistólica (PIS), (B) Pressão Intraventricular Diastólica (PID), (C) dP/dt +, (D) dP/dt -, (E) Frequência Cardíaca (FC), (F) Pressão Desenvolvida no ventrículo esquerdo, mediante a infusão de bradicinina nas concentrações (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} e 10^{-5} M). Controle n=8, epilepsia n=8, two-way ANOVA, pós-teste de Fisher.

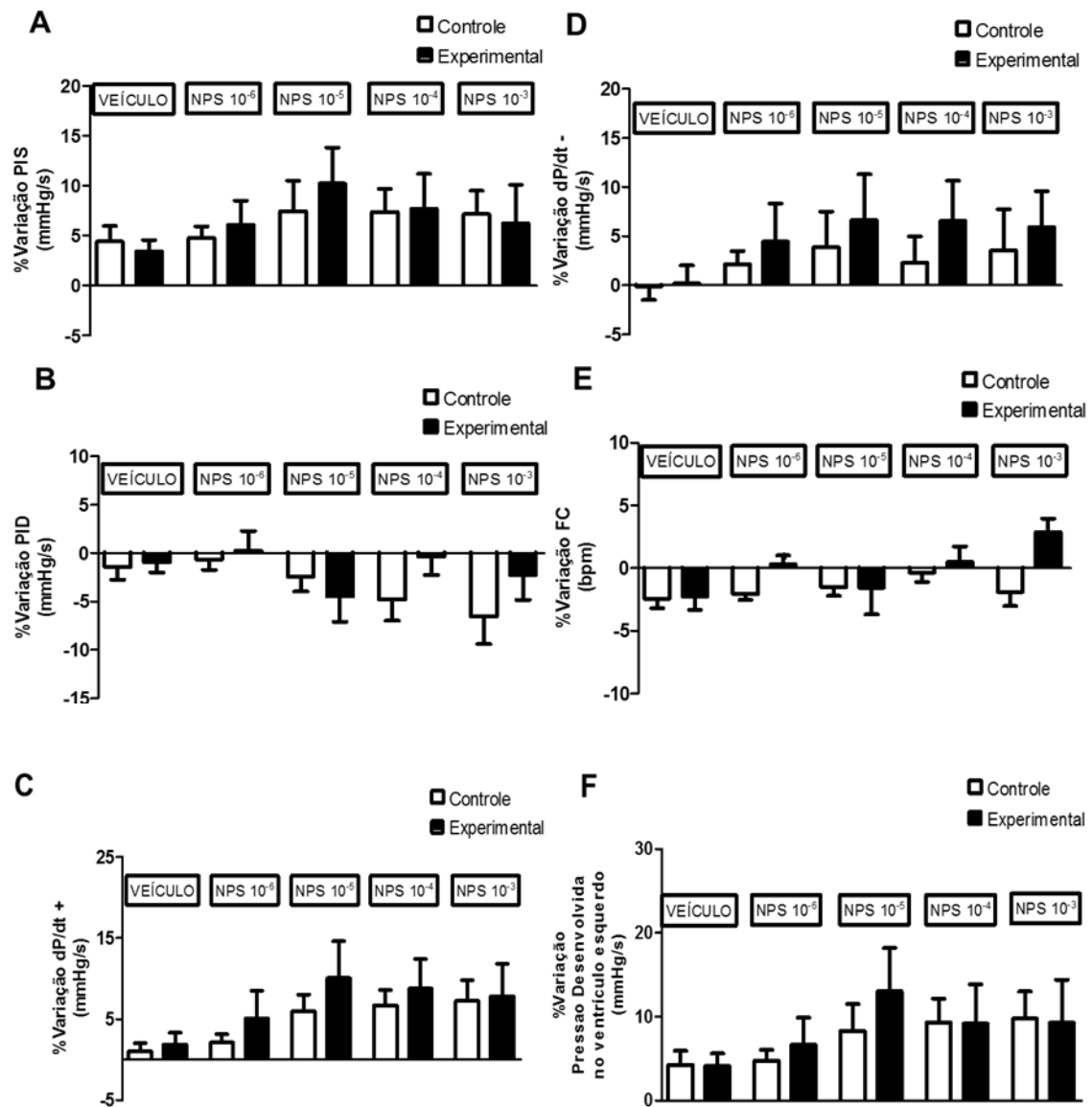


Figura 8. Porcentagem de variação de: (A) Pressão Intraventricular Sistólica (PIS), (B) Pressão Intraventricular Diastólica (PID), (C) dP/dt +, (D) dP/dt -, (E) Frequência Cardíaca (FC), (F) Pressão Desenvolvida no ventrículo esquerdo, mediante a infusão de nitroprussiato de sódio nas concentrações (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M). Controle n=8, epilepsia n=8, two-way ANOVA, pós-teste Fisher.

As análises de eNOS (Figura 9), SOD-1 (Figura 10) e catalase (Figura 11) realizadas por meio da técnica de imuno-histoquímica não apresentaram diferença significativa entre os grupos controle e epilepsia.

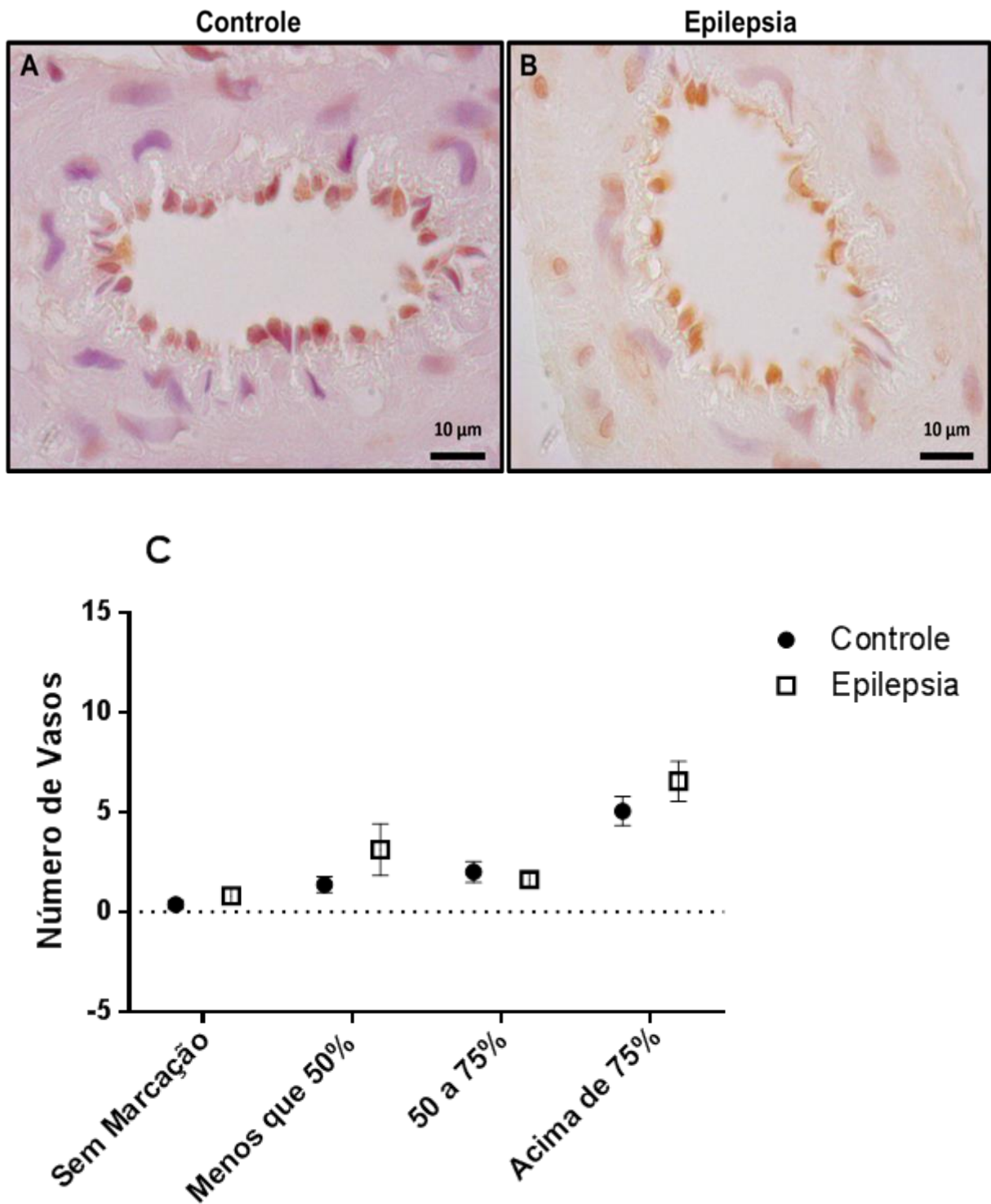


Figura 9. Expressão imuno-histoquímica de óxido nítrico sintase endotelial nas artérias. (A) Células marcadas no grupo controle (Objetiva de 100x). (B) Células marcadas no grupo epilepsia (Objetiva de 100x). (C) Porcentagem de vasos sem marcação, com até 50%, de 50 a 75%, e com mais de 75% de marcação do perímetro para eNOS.

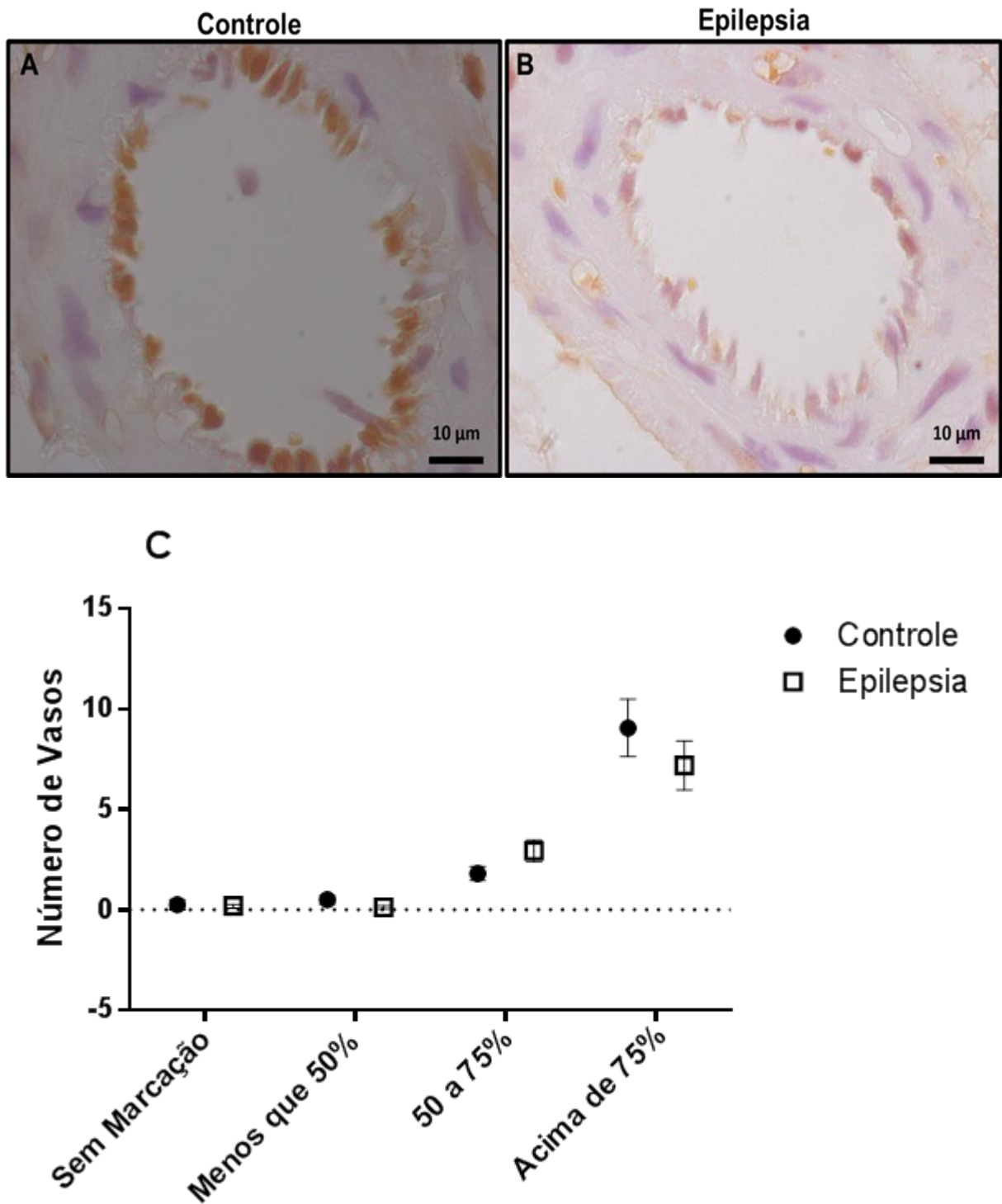


Figura 10. Expressão imuno-histoquímica de superóxido dismutase nas artérias. (A) Células marcadas no grupo controle (Objetiva de 100x). (B) Células marcadas no grupo epilepsia (Objetiva de 100x). (C) Porcentagem de vasos sem marcação, com até 50%, de 50 a 75%, e com mais de 75% de marcação do perímetro para SOD-1.

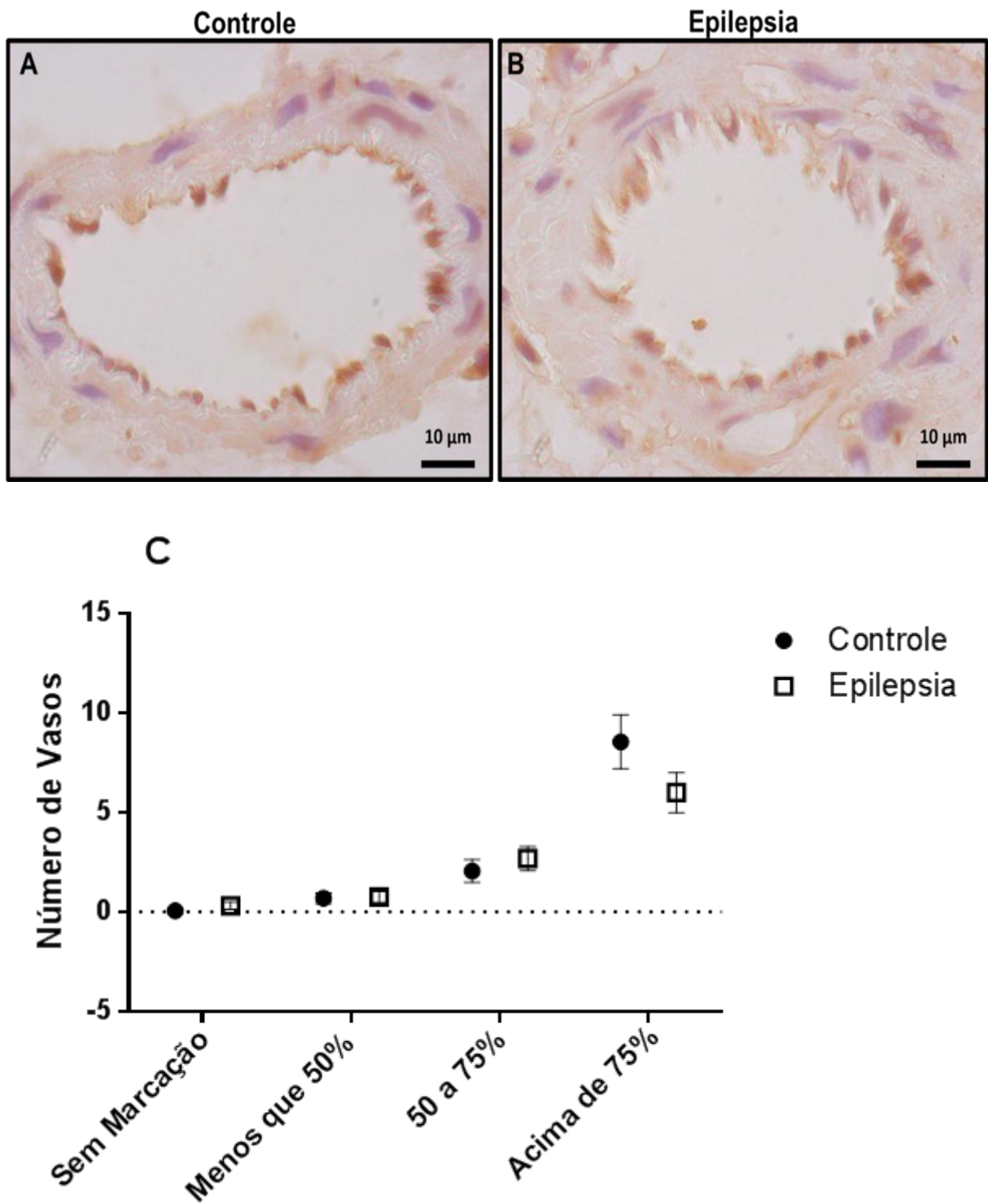


Figura 11. Expressão imuno-histoquímica de catalase nas artérias. (A) Células marcadas no grupo controle (Objetiva de 100x). (B) Células marcadas no grupo epilepsia (Objetiva de 100x). (C) Porcentagem de vasos sem marcação, com até 50%, de 50 a 75%, e com mais de 75% de marcação do perímetro para catalase.

Para avaliação da hipertrofia ventricular esquerda, foram analisados o índice de massa (peso do coração/comprimento da tíbia) e a área de secção transversa dos cardiomiócitos. Na avaliação de índice de massa, não foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 12).

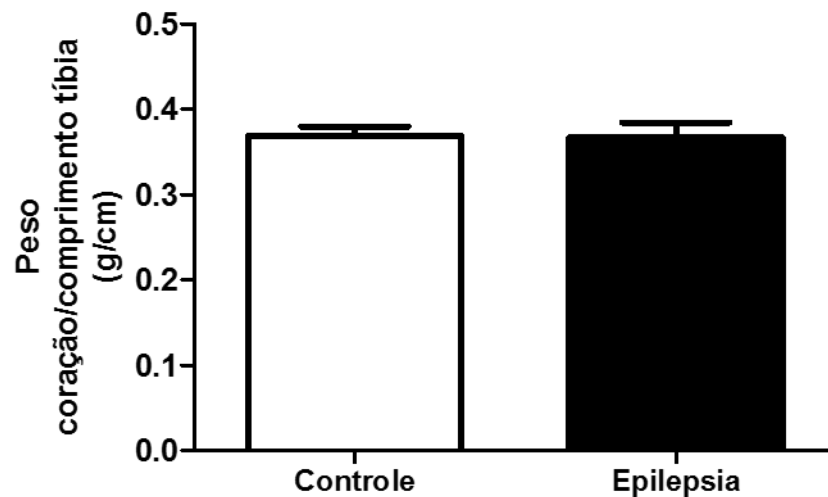


Figura 12. Razão entre o peso do coração (ventrículos esquerdo e direito) e o comprimento da tíbia do animal. Controle n=8, epilepsia n=8, teste t de student.

Na avaliação da AST, com os valores obtidos na morfometria observou-se diferença significativa entre os grupos controle (14.51 ± 0.09) e epilepsia (14.87 ± 0.09). Na figura 13 A e 13 B estão fotomicrografias representativas dos tecidos cardíacos dos ratos do grupo controle e do grupo epilepsia. A figura 13 C mostra a representação gráfica dos valores mencionados de AST.

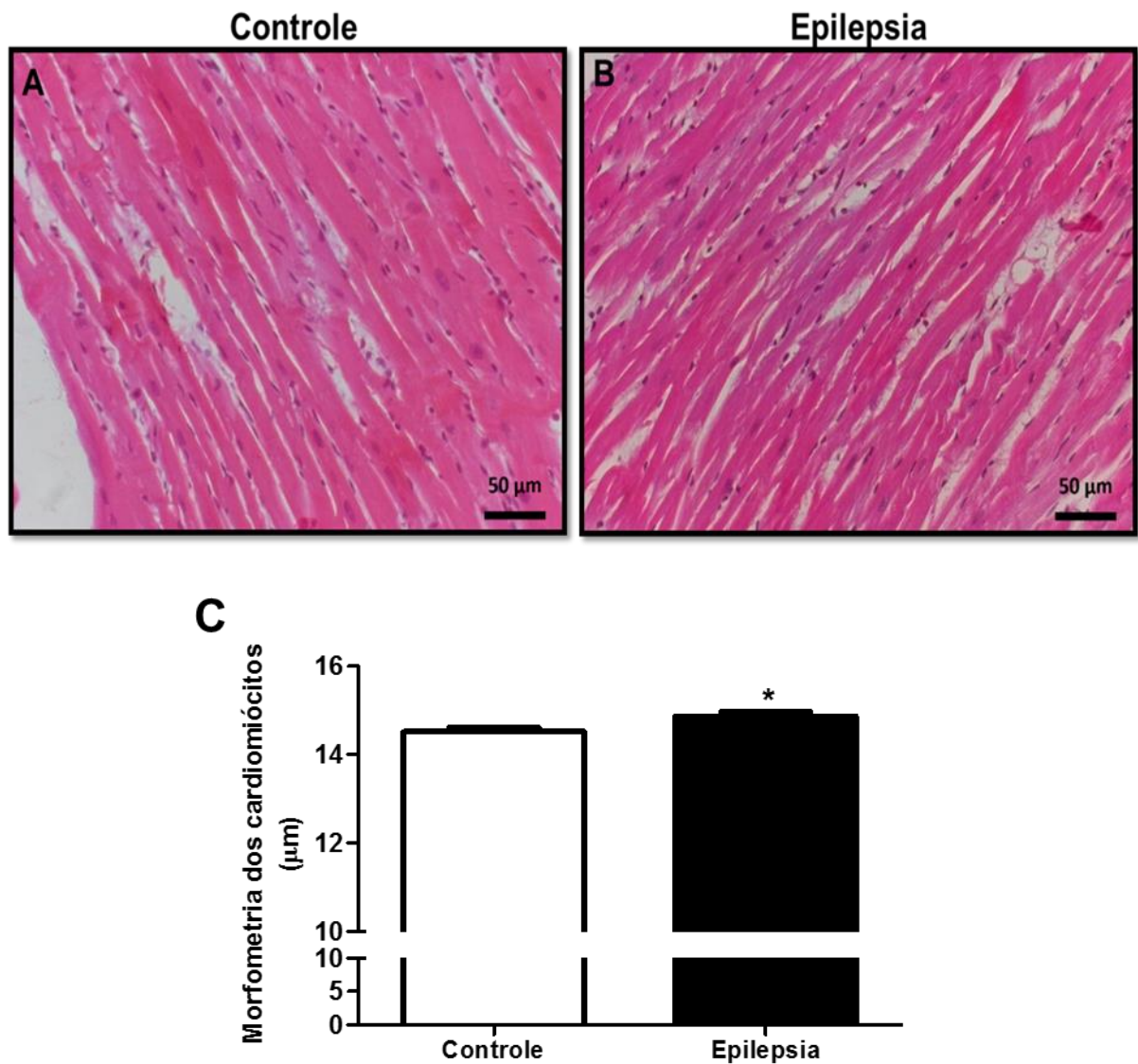


Figura 13. Morfometria dos cardiomiócitos. Cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em corte transversal do grupo controle (A) e do grupo epilepsia (B) (HE, objetiva de 20x). (C) Análise da área de secção transversa dos cardiomiócitos. Número de cardiomiócitos analisados: controle n=200, epilepsia n=200. * Indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$), teste t de student.

Em relação a avaliação de colágeno, não foi observado diferença significativa na análise de colágeno intersticial (Figura 14), porém foi observado diferença significativa no colágeno perivascular (Figura 15) entre os grupos controle (12.38 ± 0.95) e epilepsia (14.33 ± 0.98).

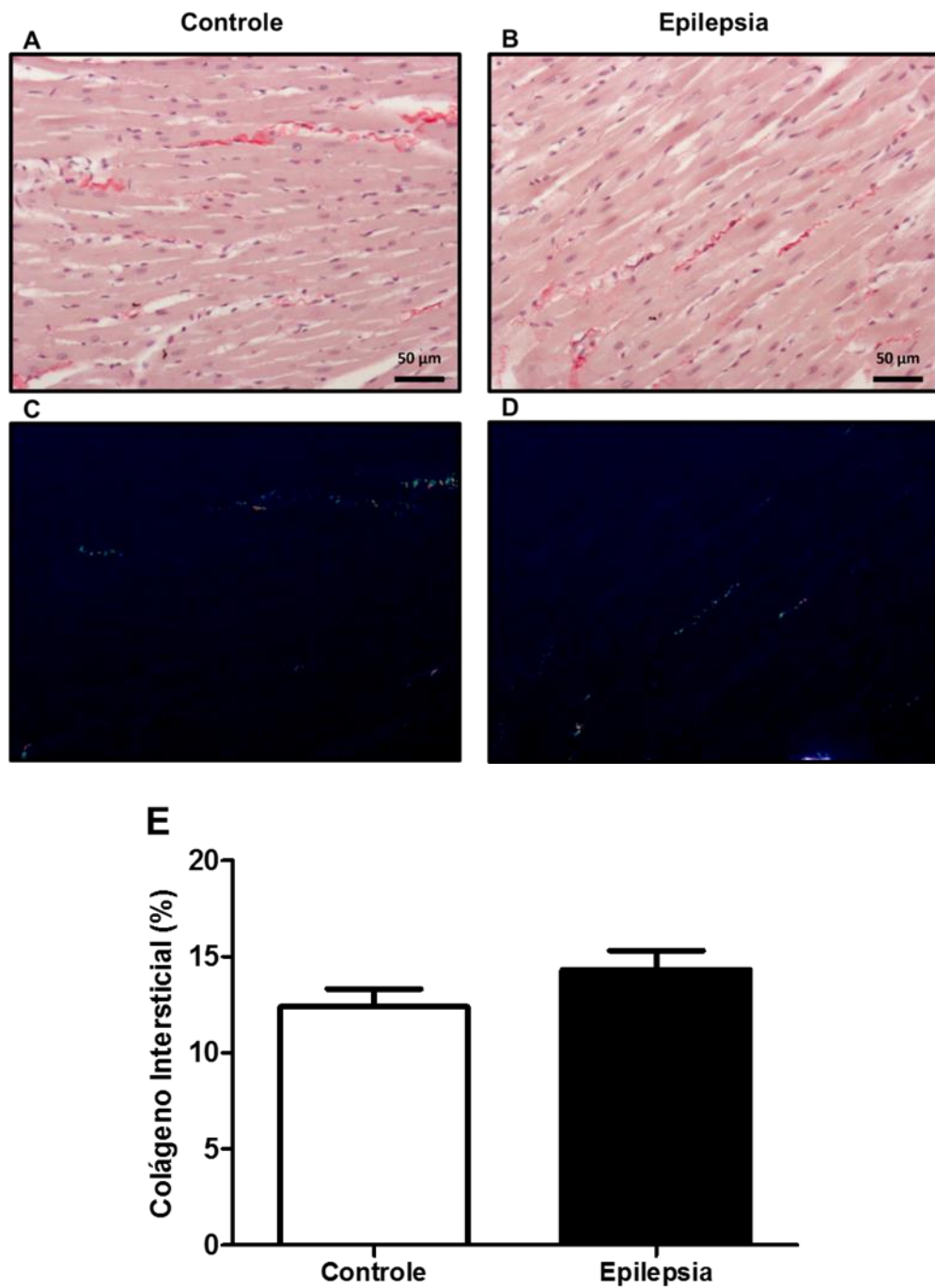


Figura 14. Análise da porcentagem de colágeno intersticial. A e B: imagens colágeno intersticial observado sob luz natural no controle e epilepsia, respectivamente (picrosírius, objetiva de 20x). C e D: imagens colágeno intersticial observado sob luz polarizada no controle e epilepsia, respectivamente (picrosírius, objetiva de 20x). E: porcentagem de colágeno intersticial, teste t de student.

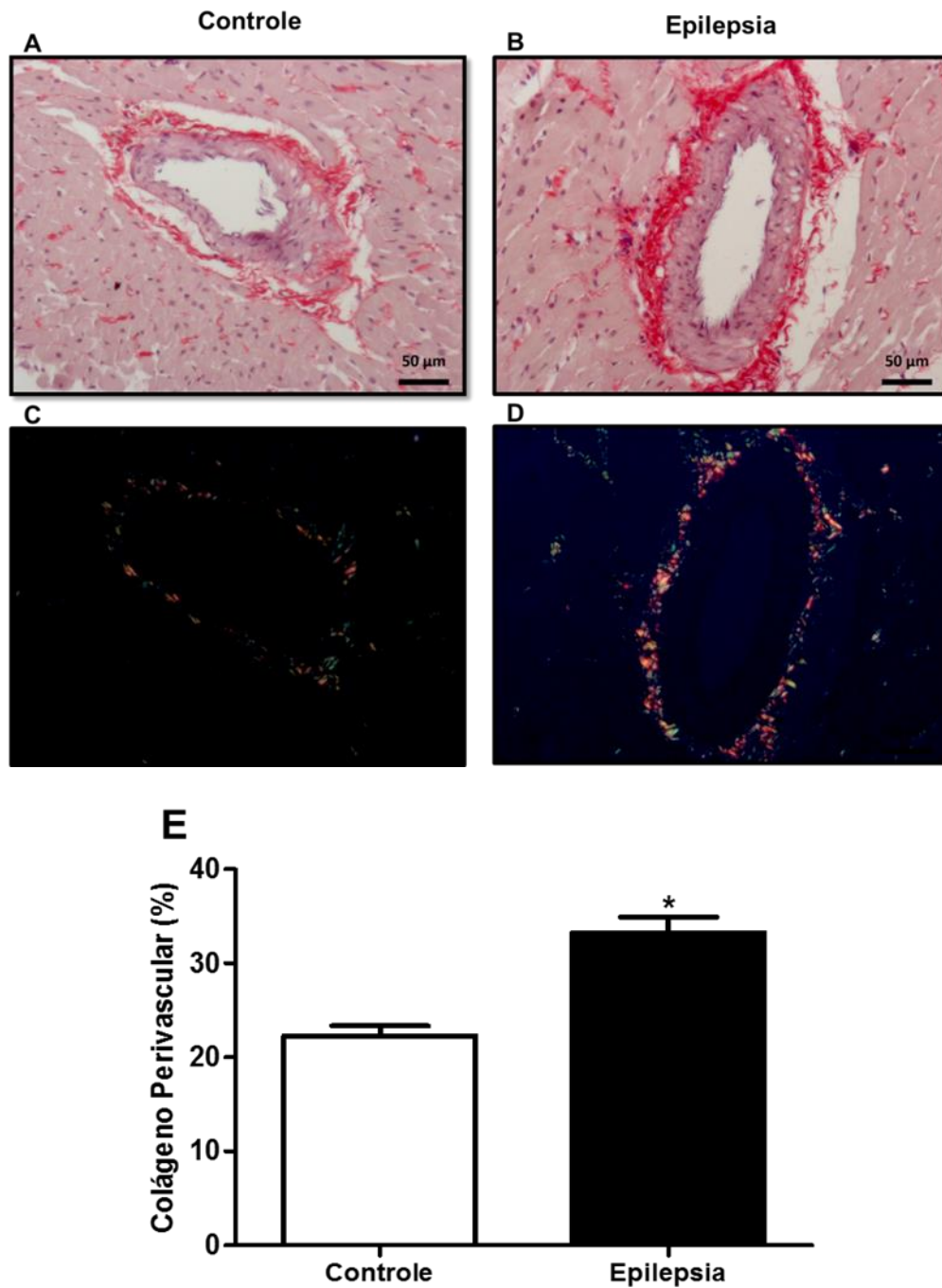


Figura 15. Análise da porcentagem de colágeno perivascular. A e B: imagens colágeno perivascular observado sob luz natural no controle e epilepsia, respectivamente (picrosírius, objetiva de 20x). C e D: imagens colágeno perivascular observado sob luz polarizada no controle e epilepsia, respectivamente (picrosírius, objetiva de 20x). E: porcentagem de colágeno perivascular. * Indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$), teste t de student.

Na análise de revascularização cardíaca foi encontrada diferença significativa entre os grupos, na qual foi observado que o grupo epilepsia apresenta uma maior quantidade de vasos no segmento central do coração, podendo ser observado assim uma menor quantidade de vasos por campo analisado (Figura 16).

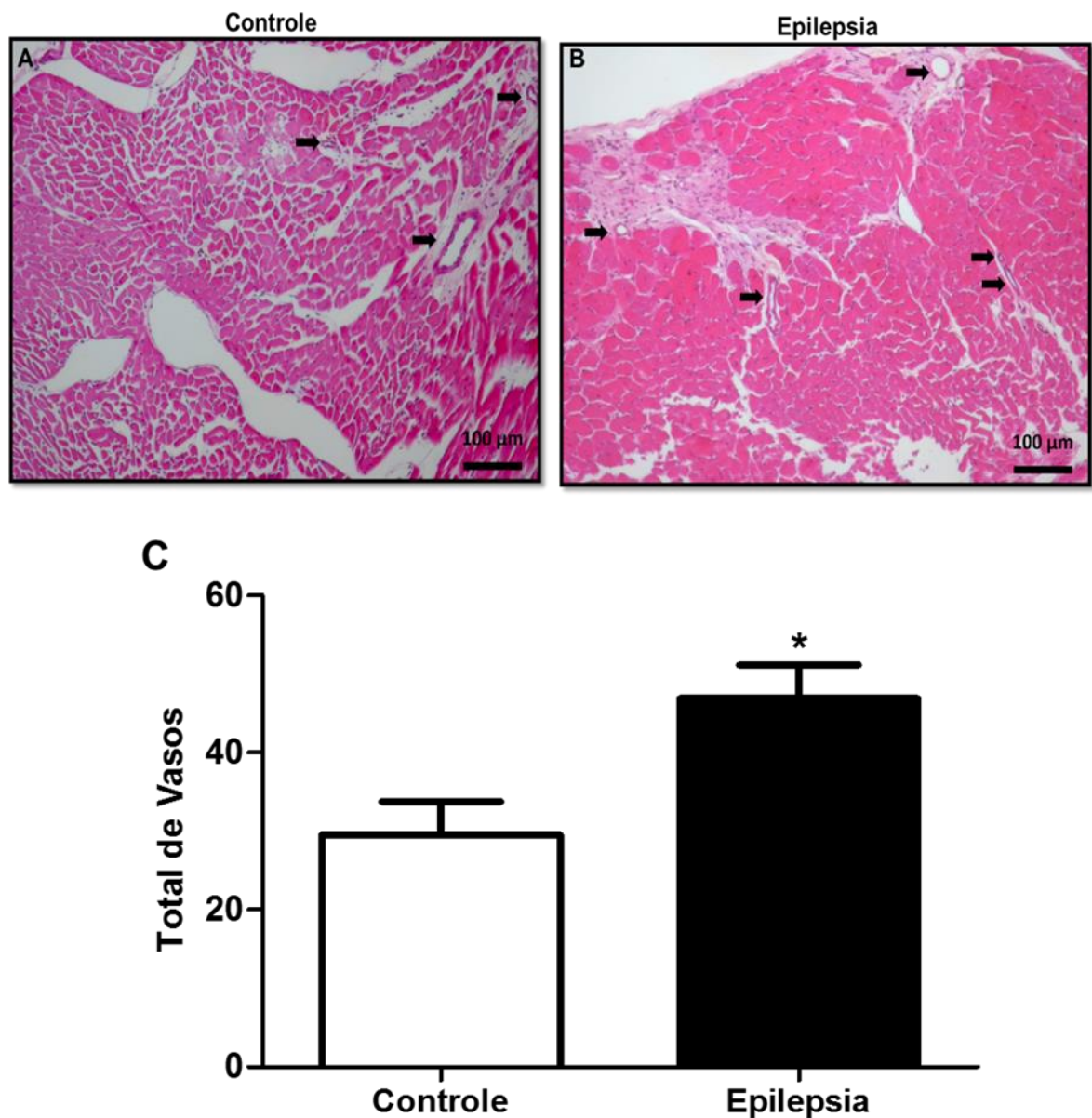


Figura 16. Avaliação de revascularização. A e B: Regiões do ventrículo esquerdo dos grupos controle e epilepsia, respectivamente (HE, objetiva de 10x). C: Quantificação absoluta de artérias no ventrículo esquerdo. * Indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). Controle $n=8$, epilepsia $n=8$, teste t de student.

5. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram: (I) o grupo epilepsia apresentou um menor relaxamento coronariano, frente ao estímulo com bradicinina, porém não foi estatisticamente diferente do grupo controle mediante o estímulo com nitroprussiato de sódio; (II) a expressão das enzimas eNOS, SOD e catalase não foram diferentes entre os grupos; (III) o grupo epilepsia apresentou um remodelamento cardíaco que foi notado através do aumento do colágeno perivascular, do número de vasos, e de aumento no tamanho dos cardiomiócitos.

Primeiramente, foi observado um menor relaxamento coronariano induzido por bradicinina nos ratos do grupo epilepsia. A ocorrência desse fato pode estar relacionada à uma redução na atividade da enzima eNOS. A eNOS é uma enzima que a partir da L - arginina (um aminoácido essencial em mamíferos) produz o Óxido Nítrico (ON) um radical livre que já há algum tempo se sabe ter produção endógena com potente ação vasodilatadora. O ON estimula a enzima guanilato ciclase solúvel, presente nas células musculares lisas dos vasos, induzindo a produção de monofosfato cíclico de guanosina que irá fosforilar a proteína quinase G (PKG) levando à ativação de várias vias intracelulares que irão promover receptação de Ca^{+2} para o retículo sarcoplasmático, inibir a entrada de Ca^{+2} por canais voltagem dependentes e por inibição de receptores de trifosfato de inositol e abertura de canais para K^{+} estimulados por Ca^{+2} . A queda da concentração do Ca^{+2} intracelular levará a desfosforilação da miosina culminando com o relaxamento da musculatura lisa (Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW, 2015).

Sabemos que a fosforilação da eNOS modula a atividade enzimática e, pelo menos, três resíduos da eNOS são fosforilados: serinas 116 (Ser¹¹⁶) (KOU; GREIF; MICHEL, 2002) e 1177 (Ser¹¹⁷⁷) (DIMMELER et al., 1999; FULTON et al., 1999; BERNIER; HALDAR; MICHEL, 2000) e treonina 495 (Thr⁴⁹⁵) (MICHELL et al., 1999; HARRIS et al., 2001). Em células endoteliais, a atividade da eNOS é reduzida por fosforilação em Thr⁴⁹⁵ (MICHELL et al., 1999) e aumentada com fosforilação em serina 1177 (DIMMELER et al., 1999; FULTON et al., 1999; BERNIER; HALDAR; MICHEL, 2000). De acordo com Kou, Greif, e Michel (2002) a fosforilação da eNOS em Ser¹¹⁶ está associada com uma diminuição da atividade da eNOS em células endoteliais. Além disto foi descrito que, após a desfosforilação de Thr⁴⁹⁵ (LIN et al., 2003) e

fosforilação em Ser¹¹⁶ (FLEMING; BUSSE, 2003), a eNOS pode estar envolvida na produção tanto de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) quanto de ON. O ânion superóxido pode reagir diretamente com o ON inativando-o ou formando o radical peroxinitrito, também um radical livre (LAURINDO; LUZ, 1995), podendo assim prejudicar o relaxamento provocado pelo ON, sem que haja alteração na expressão da eNOS, como foi observado neste trabalho.

De fato, o estresse oxidativo é uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes, ou seja, o desequilíbrio entre a formação e remoção das ERO no organismo (JÚNIOR et al., 2001). A ERO primária é o ânion superóxido que é formado pela redução do oxigênio molecular por um único elétron fornecido pela NADPH oxidase, que catalisa a reação (GENESTRA, 2007). A produção de EROs é balanceada por um eficiente sistema antioxidante, formado por moléculas capazes de retirar as EROs do organismo, prevenindo o dano celular (TAM et al., 2005). Um dos sistemas enzimáticos incluem a superóxido dismutase, que catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, bem como a catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (JÚNIOR et al., 2001). Fisiologicamente, certa quantidade de $O_2^{\cdot-}$ intracelular é requerida para a sinalização normal desempenhada pelo ON (ADACHI et al., 2004; NAKATA et al., 2008), portanto os resultados obtidos nesse estudo, em que não se tem diferença na expressão das enzimas antioxidantes SOD-1 e catalase, seja devido ao fato de que nos animais do grupo epilepsia a eNOS pode não estar envolvida na produção de superóxido, ou esteja produzindo $O_2^{\cdot-}$ em uma quantidade fisiológica.

Outra hipótese que pode explicar o menor relaxamento coronariano no grupo epilepsia frente ao estímulo com BK e que não tenha diferença entre os grupos com NPS, é que pode estar ocorrendo algum tipo de alteração no receptor B₂ de BK nesses animais, prejudicando o relaxamento, além de contribuir para o surgimento de arritmias. No estudo realizado por Driamov et al. (2004), foi mostrado que o pré-condicionamento isquêmico protege contra arritmias ventriculares induzidas por isquemia de baixo fluxo, e essa proteção envolve a ativação de receptores B₂ da bradicinina e subsequente abertura de canais de K_{ATP} sarcolemal mas não de canais K_{ATP} mitocondriais. Assim, está é uma limitação deste trabalho que precisa ser prontamente investigada.

Também testamos a reatividade coronariana com o nitroprussiato de sódio. Este sofre degradação espontânea no organismo em condições fisiológicas normais sendo o seu metabólito ativo, o ON (BARRY, 1989; ZIAI; MIRSKI, 2004), assim o ON atua diretamente no músculo liso independentemente de resposta endotelial. Portanto, nossos dados sugerem que o prejuízo do relaxamento coronariano deva ser mesmo devido a alguma alteração de ativação de enzimas e mecanismos que levem à produção do ON por fatores endoteliais.

Neste trabalho, observamos um aumento de fibras colágenas perivascular no ventrículo esquerdo nos animais do grupo epilepsia. Uma possibilidade para esse achado é a ocorrência de isquemia ou hipóxia por aumento da demanda metabólica do miocárdio durante as crises devido a hiperatividade simpática, sendo que essa hiperatividade também colabora no remodelamento cardíaco, além do prejuízo no relaxamento coronariano que foi observado. Estudos clínicos e experimentais fornecem evidências de que as crises epilépticas são acompanhadas por desequilíbrio autonômico cardiovascular com hiperatividade simpática, resultando em hipertensão, taquicardia e instabilidade elétrica no coração (WALTON, 1993; Goodman; Homan; Crawford, 1999; HOTTA; KOIZUMI; STEWART, 2009). Há evidência ampla de que a liberação de catecolaminas excessiva, devido à ativação simpática, produz efeitos cardíacos tóxicos graves, tais como a sobrecarga de Ca^{2+} intracelular, a depleção de fosfato de alta energia, arritmias ventriculares com risco de morte, e morte súbita cardíaca. O desequilíbrio entre oferta de oxigênio e demanda metabólica pode ser causado pelo aumento da atividade muscular associada com crises ou por liberação maciça de catecolaminas nas terminações nervosas simpáticas, causando um aumento da frequência cardíaca, pressão arterial e da contratilidade miocárdica (SAMUELS, 2007). A hiperatividade simpática de longa duração, conhecida por promover a apoptose miocárdica (SINGH et al., 2001) e hipertrofia cardíaca com remodelamento da câmara (WOODIWISS et al., 2001; SCHEUER, 1999), leva a pensar que seja um dos principais determinantes da insuficiência cardíaca progressiva (FAZAN et al., 2015). No estudo realizado por Nei et al. (2012), foi mostrado que vinte e seis por cento (26%) dos pacientes apresentaram desnivelamento do segmento ST durante pelo menos uma das suas crises, todas ocorreram em crises tônico-clônicas generalizadas ou tônicas, e estes tipos de crises podem levar a um maior risco de

isquemia cardíaca relacionada as crises, talvez por causa de maior estresse autonômico, com um aumento relativo da demanda de oxigenação cardíaca.

Sabe-se que pequenas alterações na concentração dos diferentes tipos de colágeno exercem importantes efeitos nas propriedades mecânicas ativas e passivas do coração (MEDUGORAC, 1982; MUKHERJEE; SEN, 1990). Além da concentração de colágeno, as proporções relativas dos tipos de colágeno também têm forte influência nesse comportamento. Consequentemente, o tecido que contém colágeno do tipo I será mais duro do que o tecido com maiores concentrações de fibras do tipo III (PEARLMAN et al., 1982). O aumento do colágeno fibrilar intersticial altera progressivamente a rigidez da diástole e a força de ejeção do ventrículo, isto porque o colágeno fibrilar que aumenta no interstício é o colágeno do tipo I, muito resistente à tração, ao contrário do colágeno do tipo II, mais passível de sofrer distensão. Portanto a elasticidade e a rigidez do estroma do miocárdio estão alteradas quando há acúmulo de colágeno tipo I, ocorrendo aumento de rigidez e provavelmente a força de contração sistólica torna-se menos eficaz, levando o ventrículo à insuficiência cardíaca (PEREIRA, 1993, SHAHBAZ et al., 2010). Dai et al. (2012) observaram em seu trabalho que não há correlação entre a proporção de fibrose perivascular e a função cardíaca, como fração de ejeção do ventrículo esquerdo, débito cardíaco, ou pressão diastólica final no ventrículo esquerdo, sugerindo assim, que a fibrose perivascular coronária ocorre independentemente da fibrose intersticial do miocárdio ou da função cardíaca. Logo, os achados neste estudo, em que o colágeno perivascular aumentado no grupo epilepsia não está comprometendo o relaxamento coronariano frente ao estímulo com NPS ocorre, provavelmente, porque o colágeno pode ser composto em maior concentração por fibras do tipo III.

A área de secção transversa dos cardiomiócitos foi utilizada como um indicador de tamanho da célula, e está aumentada nos animais do grupo epilepsia, porém não leva a uma alteração fisiológica, o que pode ser confirmado com a avaliação do índice de hipertrofia que não foi diferente entre os dois grupos. Nossos resultados não corroboram os de Painter e colaboradores (1993) que mostraram a existência de hipertrofia cardíaca em 8 de 10 pacientes com epilepsia que morreram após um episódio de estado de mal epiléptico. O que prontamente foi comprovado por Walton et al., 1995 os quais mostraram a ocorrência de hipertrofia cardíaca 8 a 12 dias à indução de estado de mal epiléptico em ratos através da injeção de

lítio/pilocarpina. Nesse estudo os autores sugerem que o tempo em que os animais permaneciam em estado de mal epiléptico não era um fator determinante no aumento da hipertrofia. Paralelamente, a ocorrência de outras alterações também foi demonstrada por outros autores, como fibrose das artérias coronárias, fibrose do miocárdio, atrofia dos miócitos, degeneração miofibrilar, fibrose subendocardial, infiltração de leucócitos, edema de tecido condutor e anormalidades morfológicas do sistema de condução (KLOSTER; ENGELSKJON, 1999; NATELSON et al., 1998; FALCONER; RAJS, 1976; OPESKIN et al., 2000). Vale ressaltar que nosso trabalho também mostrou fibrose perivascular, o que, de certa forma também pode contribuir para o prejuízo do relaxamento coronariano que demonstramos.

Neste estudo também observamos que os animais do grupo epilepsia apresentaram uma maior revascularização. Desta forma, uma hipótese para o aumento do número de vasos é a ocorrência de hipóxia no tecido cardíaco desses animais, visto que, em condições de hipóxia tecidual, é ativado a expressão de fatores de crescimento e iniciado o processo de angiogênese na zona isquêmica, a partir da rede coronariana preexistente (PUGH; RATCLIFFE, 2003). De fato, vários trabalhos mostram que pacientes com epilepsia, durante as crises, podem apresentar períodos prolongados de apneia que pode ser tanto central quanto obstrutiva o que leva, em alguns casos, a uma hipoxemia importante. Acreditamos que este fato somado à hiperativação simpática e taquicardia ictais citadas anteriormente podem acarretar a episódios em que a demanda metabólica cardíaca está muito maior do que a oferta de oxigênio, assim teríamos uma condição propícia à liberação de fatores de proliferação endoteliais culminando com o maior número de artérias coronárias encontradas no coração dos ratos com epilepsia. Porém a confirmação desta hipótese está condicionada a realização de novos trabalhos que foquem nestes mecanismos.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- Os corações dos animais com epilepsia induzida pela pilocarpina apresentaram remodelamento cardíaco observado pelo aumento de colágeno perivascular, do aumento da área de secção transversa dos cardiomiócitos e do maior número de artérias coronárias.

- Os animais com epilepsia induzida pela pilocarpina não apresentaram alteração da expressão de eNOS, SOD e catalase.

- Os animais com epilepsia apresentam prejuízo do relaxamento coronariano induzido pela bradicinina. Esta alteração não se confirmou quando o estímulo foi o nitroprussiato de sódio. Assim, acreditamos que os ratos com epilepsia apresentam deficiência do relaxamento coronariano mediado pelo endotélio, porém mais experimentos precisam ser realizados para confirmar esta hipótese bem como esclarecer em que etapa da sinalização está a alteração.

7. REFERÊNCIAS

Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, Cohen RA. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med*. 2004 Nov;10(11):1200-7.

Antoniuk SA, Oliva LV, Bruck I, Malucelli M, Yabumoto S, Castellano JL. Sudden unexpected, unexplained death in epilepsy autopsied patients. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001 Mar;59(1):40-5.

Arzamendi D, Benito B, Tizon-Marcos H, Flores J, Tanguay JF, Ly H, et al. Increase in sudden death from coronary artery disease in young adults. *AmHeartJ*. 2011;161(3):574-80.

Avanzini G, Moshé SL, Schwartzkroin PA, Engel JJr. Animal models of localization-related epilepsy. IN: *Epilepsy: A comprehensive Textbook*, eds. J. Engel Jr., T.A. Pedley, pp 427-442, Lippincott-Raven Publishers, 1997.

Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Köhling R, Biagini G, Pumain R, D'Arcangelo G, Tancredi V. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog Neurobiol*. 2002 Out;68(3):167-207

Banerjee PN, Filippi D, Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. *Epilepsy Res*. 2009 Jul;85(1):31-45.

Barry DI. Cerebrovascular aspects of antihypertensive treatment. *Am J Cardiol*. 1989 Feb;63(6):14C-18C.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross HJ, Van Emde Boas W, Engel J Jr, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshe SL, Nordli D Jr, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*. 2010 Feb; 51:676-685.

Bernier SG, Haldar S, Michel T. Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2000 Set 29;275(39):30707-15.

Blümcke I, Beck H, Lie AA, Wiestler OD. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 1999 Set;36(2-3):205-23.

Blumhardt LD, Smith PE, Owen L. Electrocardiographic accompaniments of temporal lobe epileptic seizures. *Lancet*. 1986 Mai 10;1(8489):1051-6.

Brown SW. Sudden death and epilepsy. *Seizure*. 1992 Jun;1(2):71-3.

Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. 1991 Nov-Dez;32(6):778-82.

Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci*. 1995 Fev-Mar;16(1-2):33-7.

Cavazos JE, Jones SM, Cross DJ. Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. *Neuroscience*. 2004;126(3):677-88.

Cendes F, Kobayashi E. *Epilepsia do lobo temporal*. *Epilepsia*, 2 ed. São Paulo: Lemos Editorial. 2000, p.201-13.

Cendes F. Higher resolution MRI and image modeling for predicting surgical outcome in partial epilepsy. *Neurology*. 2005 Out 11;65(7):975.

Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience*. 1987 Dez;23(3):953-68.

Colugnati DB, Gomes PA, Arida RM, de Albuquerque M, Cysneiros RM, Cavalheiro EA, et al. [Analysis of cardiac parameters in animals with epilepsy: possible cause of sudden death?]. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005 Dez;63(4):1035-41.

Dai Z, Aoki T, Fukumoto Y, Shimokawa H. Coronary perivascular fibrosis is associated with impairment of coronary blood flow in patients with non-ischemic heart failure. *J Cardiol*. 2012 Nov;60(5):416-21.

Devinsky O. Effects of Seizures on Autonomic and Cardiovascular Function. *Epilepsy Curr*. 2004 Mar;4(2):43-46.

Dichter MA. Emerging insights into mechanisms of epilepsy: implications for new antiepileptic drug development. *Epilepsia*. 1994;35(4):51-7.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999 Jun;399(6736):601-5.

Driamov S, Bellahcene M, Ziegler A, Barbosa V, Traub D, Butz S, et al. Antiarrhythmic effect of ischemic preconditioning during low-flow ischemia. The role of bradykinin and sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K(+) channels. *Basic Res Cardiol*. 2004 Jul;99(4):299-308.

Druschky A, Hilz MJ, Hopp P, Platsch G, Radespiel-Tröger M, Druschky K, et al. Interictal cardiac autonomic dysfunction in temporal lobe epilepsy demonstrated by [(123)I]metaiodobenzylguanidine-SPECT. *Brain*. 2001 Dez;124(Pt 12):2372-82

Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet*. 2006 Abr;367:1087-100.

Engel J Jr; International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2001 Jun;42(6):796-803.

Engel J Jr. Recent advances in surgical treatment of temporal lobe epilepsy. *Acta Neurol Scand*. 1992;86(5):71-80.

Falconer Be, Rajs J. Post-mortem findings of cardiac lesions in epileptics: a preliminary report. *Forensic Sci* 1976 Dez;8:63-71.

Fazan R Jr, Silva CA, Oliveira JA, Salgado HC, Montano N, Garcia-Cairasco N. Evaluation of Cardiovascular Risk Factors in the Wistar Audiogenic Rat (WAR) Strain. *PLoS One*. 2015 Jun;10(6):e0129574.

Fernandes MJ, Dube C, Boyet S, Marescaux C, Nehlig A. Correlation between hypermetabolism and neuronal damage during status epileptics induced by lithium and pilocarpine in immature and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999 Fev;19:195-209.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL,

Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014 Abr;55(4):475-82.

Fisher RS, van Emde BW, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005 Abr;46:470–472.

Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Jan;284(1):1-12.
 Forsgren L, Beghi E, Oun A, Sillanpää M. The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review. *Eur J Neurol*. 2005 Abr;12(4):245-53.

French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, et al. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol*. 1993 Dez;34(6):774-80.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999 Jun;399(6736):597-601.

Gaitatzis A, Sander JW. The mortality of epilepsy revisited. *Epileptic Disord*. 2004 Mar;6(1):3-13.

Garcia M, D'Giano C, Estellés S, Leiguarda R, Rabinowicz A. Ictal tachycardia: its discriminating potential between temporal and extratemporal seizure foci. *Seizure*. 2001 Set;10(6):415-9.

Gastaut H. Dictionary of epilepsy, part 1 definitions. Geneva: World Health Organisation; 1973.

Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. 2007 Set;19(9):1807-19.

Goodman JH, Homan RW, Crawford IL. Kindled seizures activate both branches of the autonomic nervous system. *Epilepsy Res*. 1999 Abr;34(2-3):169-76.

Haerem, J.W. Sudden unexpected coronary death: the occurrence of platelet aggregates in the epicardial and myocardial vessels of man. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand*. 1978; 265:1-47.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford: University Press; 2007.

Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, et al. Disruption of them1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13311–13316.

Harris MB, Ju H, Venema VJ, Liang H, Zou R, Michell BJ, et al. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem*. 2001 Mai 11;276(19):16587-91.

Hesdorffer DC, Tomson T, Benn E, Sander JW, Nilsson L, Langan Y, et al. Commission on Epidemiology; Subcommission on Mortality. Combined analysis of risk factors for SUDEP. *Epilepsia*. 2011;52(6):1150-9.

Hesdorffer DC, Tomson T. Sudden unexpected death in epilepsy. Potential role of antiepileptic drugs. *CNS Drugs*. 2013 Fev;27(2):113-9.

Hotta H, Koizumi K, Stewart M. Cardiac sympathetic nerve activity during kainic acid-induced limbic cortical seizures in rats. *Epilepsia*. 2009 Abr;50(4):923-7.

Jeffrey J. Goldberger, Michael E. Cain, Stefan H. Hohnloser, et al. *J Am Coll Cardiol*, 2008; 52:1179-1199.

Jeong SW, Lee SK, Hong KS, Kim KK, Chung CK, Kim H. Prognostic factors for the surgery for mesial temporal lobe epilepsy: longitudinal analysis. *Epilepsia*. 2005 Ago;46(8):1273-9.

Júnior LR, Höehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova*. 2001 Jan/Fev; 24(1):112-119.

Keilson MJ, Hauser WA, Magrill JP. Electrocardiographic changes during electrographic seizures. *Arch Neurol*. 1989 Nov;46(11):1169-70.

Keilson MJ, Hauser WA, Magrill JP, Goldman M. ECG abnormalities in patients with epilepsy. *Neurology*. 1987 Out;37(10):1624-6.

Kloster R, Engelskjon T. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP): a clinical perspective and a search for risk factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999 Oct;67:439-444.

Kou R, Greif D, Michel T. Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A. *J Biol Chem*. 2002 Aug 16;277(33):29669-73.

Koyama R, Ikegaya Y. Mossy fiber sprouting as a potential therapeutic target for epilepsy. *Curr Neurovasc Res*. 2004 Jan;1(1):3-10.

Kwan P, Sander JW. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 Oct;75(10):1376-81.

Laurindo FRM, Luz PL. Espécies Ativas de Oxigênio Podem Contribuir para Aumento da Resistência Vascular Periférica na Hipertensão: Uma Hipótese. *Hiper Ativo* 1995;2(2).

Laxer KD, Trinka E, Hirsch LJ, Cendes F, Langfitt J, Delanty N, et al. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy Behav*. 2014 Aug;37:59-70.

Leestma, J.E. Sudden, unexpected death associated with seizures: a pathological review. In: Lathers, C.M., Schraeder, P.L. (Eds.), *Epilepsy and sudden death*. Marcel Dekker, New York, 1990; 61-88.

Leestma JE, Walczak T, Hughes JR, Kalelkar MB, Teas SS. A prospective study on sudden unexpected death in epilepsy. *Ann Neurol*. 1989 Aug;26(2):195-203.

Lehmann TN, Gabriel S, Eilers A, Njunting M, Kovacs R, Schulze K, et al. Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. *Eur J Neurosci* 2001;14:83–95.

Leite JP, Bortolotto ZA, Cavaleiro EA. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*. 1990;14(4):511-7.

Leutmezer F, Schernthaner C, Lurger S, Pötzelberger K, Baumgartner C. Electrocardiographic changes at the onset of epileptic seizures. *Epilepsia*. 2003 Mar;44(3):348-54.

Lin MI, Fulton D, Babbitt R, Fleming I, Busse R, Pritchard KA Jr, et al. Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J Biol Chem*. 2003 Nov 7;278(45):44719-26.

Mathern GW, Babb TL, Armstrong DL. Hippocampal sclerosis. In Engel J Jr, Pedley TA (Eds). *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997:133-155.

Matsuo M, Kaneko T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radak Z. (ed.). *Free radicals in exercise and aging*. Champaign: Human Kinetics; 2001. p. 1-33.

Medugorac I. Characterization of intramuscular collagen in mammalian left ventricle. *Basic Res Cardiol*. 1982 Nov-Dec;77(6):589-98.

Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*. 1993 Nov-Dec;34(6):985-95.

Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, de Montellano PR, Kemp BE, Pearson RB. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol*. 1999 Aug 12;9(15):845-8.

Mukherjee D, Sen S. Collagen phenotypes during development and regression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1990 Dec;67(6):1474-80.

Nagao T, Alonso A, Avoli M. Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. *Neuroscience*. 1996 May;72(2):399-408.

Naik N, Yadav R. Genetics of sudden death. *Indian J Med Res*. 2010;132(5):579-83.

Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K, et al. Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Circulation*. 2008 Apr 29;117(17):2211-23.

Nashef L, Ryvlin P. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP): update and reflections. *Neurol Clin*. 2009 Nov;27(4):1063-74.

Natelson BH, Suarez RV, Terrence CF, Turizo R. Patients with epilepsy who die suddenly have cardiac disease. *Arch Neurol*. 1998 Jun;55(6):857-60.

Nei M. Cardiac effects of seizures. *Epilepsy Curr*. 2009 Jul-Ago;9(4):91-5.

Nei M, Hays R. Sudden unexpected death in epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2010 Jul;10(4):319-26.

Nei M, Ho RT, Abou-Khalil BW, Drislane FW, Liporace J, Romeo A, et al. EEG and ECG in sudden unexplained death in epilepsy. *Epilepsia*. 2004 Abr;45(4):338-45.

Nei M, Ho RT, Sperling MR. EKG abnormalities during partial seizures in refractory epilepsy. *Epilepsia*. 2000 May;41(5):542-8.

Nei M, Sperling MR, Mintzer S, Ho RT. Long-term cardiac rhythm and repolarization abnormalities in refractory focal and generalized epilepsy. *Epilepsia*. 2012 Ago;53(8).

Novak V, Reeves AL, Novak P, Low PA, Sharbrough FW. Time-frequency mapping of R-R interval during complex partial seizures of temporal lobe origin. *J Auton Nerv Syst* 1999;77:195–202.

Olney JW, de Gubareff T, Labruyere J. Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents. *Nature*. 1983 Fev;301(5900):520-2.

Opeskin K, Thomas A, Berkovic SF. Does cardiac conduction pathology contribute to sudden unexpected death in epilepsy? *Epilepsy Res*. 2000 Jun;40(1):17-24.

Opherk C, Coromilas J, Hirsch LJ. Heart rate and EKG changes in 102 seizures: analysis of influencing factors. *Epilepsy Res*. 2002 Dec;52(2):117-27.

Paglioli-Neto E, Cendes F. Tratamento cirúrgico: In Guerreiro CA, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes (eds). *Epilepsia*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000;379-393.

Painter JA, Shiel FO, Delorenzo RJ. Cardiac pathology findings in status epilepticus. *Epilepsia* 1993;34(6):30.

Pansani AP, Colugnati DB, Sonoda EY, Arida RM, Cravo SL, Schoorlemmer GH, et al. Tachycardias and sudden unexpected death in epilepsy: a gold rush by an experimental route. *Epilepsy Behav.* 2010 Nov;19(3):546-7.

Pearlman ES, Weber KT, Janicki JS, Pietra GG, Fishman AP. Muscle fiber orientation and connective tissue content in the hypertrophied human heart. *Lab Invest.* 1982 Feb;46(2):158-64.

Pedley TA, Bazil CW, Morrell MJ. Epilepsy. In Rowland LP (Ed). *Merritt's neurology*. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins, 2000: 663-641.

Pereira FEL. Hipertrofia cardíaca: Aspectos Morfológicos e Clínicos. In: *Contratilidade Miocárdica. Aspectos Básicos e Clínicos*, 1.ed. São Paulo; 1993. p. 29-40.

Priel MR, Albuquerque EX. Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture. *Epilepsia.* 2002;43(5):40-6.

Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):677-84.

Rea T, Page RL. Community approaches to improve resuscitation after out-of-hospital cardiac arrest. *Circulation.* 2010; 121: 1134-1140.

Rocamora R, Kurthen M, Lickfett L, Von Oertzen J, Elger CE. Cardiac asystole in epilepsy: clinical and neurophysiologic features. *Epilepsia.* 2003 Feb;44(2):179-85.

Ronkainen E, Ansakorpi H, Huikuri HV, Myllylä VV, Isojärvi JI, Korpelainen JT. Suppressed circadian heart rate dynamics in temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Oct;76(10):1382-6.

Roger J, Lob H, Tassinari CA. Status epilepticus. In Magnus O, de Lorentz Haas AM (Ed) *Handbook of clinical neurology*, Vol. 15. The epilepsies. Amsterdam: North Holland Publishing Company, 1974:145–188.

RYVLIN, P.; MONTAVONT, A.; KAHANE, P. Sudden unexpected death in epilepsy: from mechanisms to prevention. *Curr Opin Neurol.*, v. 19, p. 194 – 199, 2006.

Samuels MA. The brain-heart connection. *Circulation.* 2007 Jul;116(1):77-84.

Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol.* 2003 Abr;16:165-70.

SANABRIA, E. R. G; CAVALEIRO, E. A. Epileptogênese: contribuição dos modelos experimentais. In GUERREIRO C.A.M. et al. *Epilepsia*. Cap. 4. Lemos editorial e gráficas LTDA. 2000. p. 29-57.

Sander JW, Shorvon SD. Incidence and prevalence studies in epilepsy and their methodological problems: a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987 Jul;50:829-839.

Shahbaz AU, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC, McGee JE, et al. Fibrosis in hypertensive heart disease: molecular pathways and cardioprotective strategies. *J Hypertens.* 2010 Set;28(1):25-32.

Scheuer J. Catecholamines in cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol.* 1999 Jun 17;83(12A):70H-74H.

Schmidt D, Loscher W: Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia* 2005 Jun; 46:858-877.

Schuele SU, Widdess-Walsh P, Bermeo A, Lüders HO. Sudden unexplained death in epilepsy: the role of the heart. *Cleve Clin J Med.* 2007 Fev;74(1):S121-7.

Scorza F, Tucci PJ. Sudden Death in Brazil: Epilepsy Should be in Horizon. *Arq Bras Cardiol.* 2015 Ago;105(2):197-8.

Sevcencu C, Struijk JJ. Autonomic alterations and cardiac changes in epilepsy. *Epilepsia.* 2010 Mai;51(5):725-37.

Shorvon SD. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia.* 2011 Jun;52(6):1052-7.

Singh K, Xiao L, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis. *J Cell Physiol.* 2001 Dez;189(3):257-65.

Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology.* 2006; 13: 129-42.

Sloviter RS, Zappone CA, Bumanglag AV, Norwood BA, Kudrimoti H. On the relevance of prolonged convulsive status epilepticus in animals to the etiology and neurobiology of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 8:6-10.

Smolders I, Khan GM, Manil J, Ebinger G, Michotte Y. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol*. 1997 Jul;121(6):1171-9.

Spencer SS. Neuronal networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment. *Epilepsia*. 2002 Mar;43(3):219-27.

Surges R, Taggart P, Sander JW, Walker MC. Too long or too short? New insights into abnormal cardiac repolarization in people with chronic epilepsy and its potential role in sudden unexpected death. *Epilepsia*. 2010 May;51(5):738-44.

Surges R, Thijs RD, Tan HL, Sander JW. Sudden unexpected death in epilepsy: risk factors and potential pathomechanisms. *Nat Rev Neurol*. 2009 Sep;5(9):492-504.

Stein PK, Kleiger RE. Insights from the study of heart rate variability. *Annu Rev Med*. 1999;50:249-61.

Stöllberger C, Finsterer J. Cardiorespiratory findings in sudden unexplained/unexpected death in epilepsy (SUDEP). *Epilepsy Res*. 2004 Mar;59(1):51-60.

Sutula T, He X X, Cavazos J, Scott G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 1998 Mar; 239:1147-1150.

Tam LS, Li EK, Leung VY, Griffith JF, Benzie IF, Lim PL, et al. Effects of vitamins C and E on oxidative stress markers and endothelial function in patients with systemic lupus erythematosus: a double blind, placebo controlled pilot study. *J Rheumatol*. 2005; 32(2):275–282.

Thiene G, Carturan E, Corrado D, Basso C. Prevention of sudden cardiac death in the young and in athletes: dream or reality? *Cardiovasc Pathol*. 2010;19(4):207-17.

Thom M, Mathern GW, Cross JH, Bertram EH. Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome? *Ann Neurol*. 2010 Oct;68(4):424-34.

Tigaran S, Mølgaard H, McClelland R, Dam M, Jaffe AS. Evidence of cardiac ischemia during seizures in drug refractory epilepsy patients. *Neurology*. 2003 Feb 11;60(3):492-5.

Tomson T, Ericson M, Ihrman C, Lindblad LE. Heart rate variability in patients with epilepsy. *Epilepsy Res.* 1998 Mar;30(1):77-83.

Tomson T, Nashef L, Ryvlin P. Sudden unexpected death in epilepsy: current knowledge and future directions. *Lancet Neurol.* 2008 Nov;7(11):1021-31.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983 Sep;9(3):315-35.

Turski WA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia* 1983b;39:1408–11.

Velagapudi P, Turagam M, Laurence T, Kocheril A. Cardiac arrhythmias and sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP). *Pacing Clin Electrophysiol.* 2012 Mar;35(3):363-70.

Virmani R, Burke AP, Farb A. Sudden cardiac death. *Cardiovasc Pathol.* 2001;10(6):275-82.

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015 Oct;129(2):83-94.

ZIAI CW, MIRSKI MA. Blood Pressure Management in the Neurocritical Care Patient. In: SUAREZ, JI. *Critical care neurology and neurosurgery.* 1^a ed. Humana Press Inc, Totowa- NJ; 2004. p. 254-256.

Walton NY. Systemic effects of generalized convulsive status epilepticus. *Epilepsia.* 1993;34 (1):54-8.

Walton NY, Rubinstein BK, Treiman DM. Cardiac hypertrophy secondary to status epilepticus in the rat. *Epilepsy Res.* 1995 Feb;20(2):121-4.

Wiebe S. Epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Can J Neurol Sci.* 2000 May;27(1):S6-10; discussion S20-1.

Winkel BG, Holst AG, Theilade J, Kristensen IB, Thomsen JL, Ottesen GL, et al. Nationwide study of sudden cardiac death in persons aged 1-35 years. *Eur Heart J*. 2011;32(8):983-90.

Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, et al. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation*. 2001 Jan 2;103(1):155-60.

Yoon HH, Kwon HL, Mattson RH, Spencer DD, Spencer SS. Long-term seizure outcome in patients initially seizure-free after resective epilepsy surgery. *Neurology*. 2003 Aug 26;61(4):445-50.