



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

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES RELACIONADAS
AO EFEITO DE DROGAS ANTIEPILÉPTICAS EM RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE INDUÇÃO DE EPILEPSIA PELA PILOCARPINA**

BEATRIZ PACHECO DE SOUZA

GOIÂNIA

2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
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: Beatriz Pacheco de Souza

Título do trabalho: Avaliação de alterações cardiovasculares relacionadas ao efeito de drogas antiepilépticas em 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.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Diego Basilio Cortez
Professor Adjunto
Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 13 / 06 / 18

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.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

BEATRIZ PACHECO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES RELACIONADAS
AO EFEITO DE DROGAS ANTIEPILÉPTICAS EM 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.

Orientador: Prof. Dr. Diego Basile Colugnati.

GOIÂNIA

2018

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

Pacheco de Souza, Beatriz

Avaliação de Alterações Cardiovasculares Relacionadas ao Efeito de Drogas Antiepilépticas em Ratos Submetidos ao Modelo de Indução de Epilepsia pela Pilocarpina [manuscrito] / Beatriz Pacheco de Souza. - 2018.

XIX, 72 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Diego Basile Colugnati.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Goiânia, 2018.

Bibliografia. Apêndice.

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

1. Epilepsia. 2. Pilocarpina. 3. Carbamazepina. 4. Lamotrigina. 5. Sistema cardiovascular. 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

1 **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 11**

2 Aos dezoito dias do mês de maio do ano de dois mil e dezoito, às catorze
3 horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas IV da Universidade
4 Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof.
5 Dr. Diego Basile Colugnati, Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior e Prof. Dr.
6 Carlos Henrique de Castro para, em sessão pública presidida pelo primeiro
7 examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada
8 "AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES RELACIONADAS AO
9 EFEITO DE DROGAS ANTIEPILEPTICAS EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO
10 DE INDUÇÃO DE EPILEPSIA PELA PILOCARPINA", em nível de mestrado, de
11 autoria de **Beatriz Pacheco de Souza**, discente do Programa Multicêntrico de
12 Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Goiás. A
13 sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros
14 da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em
15 cerca de trinta minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho.
16 Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada,
17 tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de
18 arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que
19 consta na Resolução nº1558 de 2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa,
20 Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa Multicêntrico de
21 Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, a dissertação foi aprovada,
22 considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção
23 do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de
24 Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva
25 da dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas
26 pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa.



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

27 Cumpridas as formalidades de pauta, às dez horas e 210 minutos,
28 encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Renato César Rodrigues,
29 Assistente em Administração da Universidade Federal de Goiás, lavrei a
30 presente ata que, após lida e aprovada, será assinada por seus membros em
31 três vias de igual teor.

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

Prof. Dr. Diego Basile Colugnati

Presidente da Banca

Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior

Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro

Universidade Federal de Goiás

BEATRIZ PACHECO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES RELACIONADAS
AO EFEITO DE DROGAS ANTIEPILÉPTICAS EM RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE INDUÇÃO DE EPILEPSIA PELA PILOCARPINA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Carlos Henrique Castro
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Diego Basile Colugnati
Universidade Federal de Goiás

Aprovada em: ____/____/____

DEDICATÓRIA

Ao meu querido pai, Edimar Ribeiro de Souza por estar ao meu lado não só nos momentos de alegria. Por me apoiar sempre que necessário, mas também me deixar caminhar sozinha e aprender a buscar com meus esforços o que desejava e, por me incentivar e ensinar que por meio dos estudos eu conseguiria realizar muitos destes desejos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Diego Basile Colugnati, pela oportunidade, ensinamentos, confiança e paciência durante a realização e concretização deste trabalho.

Aos professores do Laboratório Integrado de Fisiopatologia Cardiovascular e Neurológica Dr. Carlos Henrique de Castro, Dra. Elizabeth Pereira Mendes e Dra. Aline Priscila Pansani pelo exemplo de profissionalismo e pela disponibilidade em ajudar sempre que solicitados.

A Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos, por oferecer o Laboratório de Histologia para a execução de parte dos experimentos.

A todos os companheiros de trabalho, que também fizeram parte da minha formação compartilhando risadas e conhecimento que continuarão presentes em minha memória. Agradeço pela ajuda com materiais, técnicas, discussões, desabafos em uma demonstração de amizade e solidariedade que tornaram a jornada mais leve. Agradeço em especial a Me. Karina Pereira Gomes pela disponibilidade em me ajudar, colaborando em vários momentos que precisei.

Aos meus pais, Edimar e Maria de Lourdes, por todo o amor e dedicação pela minha educação e caráter sólidos, por terem acreditado nos meus sonhos e na minha capacidade em realizá-los.

As minhas irmãs Patrícia e Camila, pelo companheirismo, paciência e por sonhar junto comigo, sempre estando prontas em me ajudar. Por acompanharem de perto cada etapa deste trabalho sempre me incentivando e me ouvindo, por aturar meus vários momentos de estresse e por todo carinho.

A todos os meus familiares, por sempre me apoiarem e entenderem a minha ausência.

Aos grandes amigos que conheci durante minha vida e que participaram de vários momentos de alegria e dificuldades, seja da fase do colégio, graduação, pós-graduação ou em outros momentos. Obrigada pelas vezes que compreenderam minha falta de tempo, meu estresse e meu sono incontrolável. Em especial agradeço a Beatriz, Giselly, Kamila, Lays e Arthur que além de tudo, me acompanharam nas diversas conversas de boteco ou um simples momento de descanso e pelos momentos de diversão que me proporcionaram.

Também em especial, agradeço ao colega de Laboratório e amigo Dr. Allancer Divino de Carvalho Nunes por todo companheirismo na pesquisa durante a realização deste trabalho, pela enorme disponibilidade (mesmo na Suíça) em ajudar tanto no campo profissional quanto no pessoal. Pelos momentos de descontração e pelos “puxões de orelha” que culminaram na nossa amizade.

As agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEG, pelo suporte financeiro.

Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE QUADROS	XVIII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XXI
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Epilepsia	1
1.2- Epidemiologia	5
1.3- Epilepsia do Lobo Temporal	7
1.4- Alterações Cardiovasculares na Epilepsia.....	8
1.5- DAEs e Alterações Cardiovasculares	10
1.6- Modelo de Indução de Epilepsia pela Pilocarpina.....	16
2- OBJETIVOS	19
2.1- Objetivo Geral	19
2.2- Objetivos Específicos	19
3- METODOLOGIA	20
3.1- Animais	20
3.2- Tratamento com DAEs	20
3.3- Protocolo Experimental para Indução de Epilepsia	21
3.4- Monitoramento de Crises	21
3.5- Procedimentos Cirúrgicos	22
3.6- Protocolo de Registro Acordado	23
3.6.1- Teste de Barorreflexo.....	24

3.6.2- Desafio com Isoproterenol	25
3.7- Análise do Traçado Eletrocardiográfico	26
3.8- Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca	26
3.9- Índices de Massas	27
3.10- Análise Histológica	28
3.11- Análise Estatística	31
4- RESULTADOS	32
4.1- Frequência de Crises	32
4.2- Parâmetros Cardiovasculares Basais	32
4.3- Teste de Barorreflexo	35
4.4- Desafio com Isoproterenol	36
4.5- Variabilidade da Frequência Cardíaca	37
4.5.1 - Análise no Domínio do Tempo	37
4.5.2 - Análise no Domínio da Frequência	38
4.5.3 - Análise Simbólica	39
4.6- Análises Estruturais e Morfológicas.....	40
5- DISCUSSÃO	47
6- CONCLUSÃO	53
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÊNDICE	68
Variabilidade da Frequência cardíaca	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amg – Amígdala

AMPA – alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ANOVA – Análise de Variância

cAMP – Monofosfato Cíclico de Adenosina

BNP – Brain Natriuretic Peptide (Peptídeo Natriurético Cerebral)

Ca⁺ – Cálcio

CBZ – Carbamazepina

CBZ-E – Carbamazepina-10,11-epóxido

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CK-MB – Creatina Quinase

cm – Centímetro

CNT – Controle

CREB – cyclic amp-response element binding

Crtx – Córtex

DAE – Antiepileptic Drugs (Drogas Antiepilépticas)

DCV – Doença Cardiovascular

ECG – Eletrocardiograma

EEG – Eletroencefalograma

ELT – Epilepsia do Lobo Temporal

ELTM – Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

EP – Epiléptico

EPM – Erro Padrão da Média

EUA – Estados Unidos da América

FC – Frequência Cardíaca

GABA – Ácido γ -aminobutírico

Glu – Glutamato

HF – High Frequency (Alta Frequência)

Hpc – Hipocampo

Hpt – Hipotálamo

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

If – Corrente Funny

ILAE – International League Against Epilepsy (Liga Internacional Contra a Epilepsia)

iRR – intervalos RR

ISO – Isoproterenol

K⁺ – Potássio

KCl – Cloreto de Potássio

kg – kilograma

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LF – Low Frequency (Baixa Frequência)

LTG – Lamotrigina

mg – miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

Na⁺ – Sódio

NMDA – N-metil D-aspartato

NPS – Nitroprussiato de Sódio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAD – Pressão Arterial Diastólica

PAM – Pressão Arterial Média

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PHE – Phenylephrine (Fenilefrina)

PILO – Pilocarpina

PKA – Proteinoquinase A

RMSSD – Root Mean Square of the Successive Differences (Raiz Quadrada da Média do Quadrado das Diferenças entre iRR Normais Adjacentes)

SDNN – Standard Deviation of NN (Desvio Padrão de Todos os iRR Normais)

SE – *Status Epilepticus*

SNA – Sistema Nervoso Aautônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SUDEP – Sudden Unexpected Death in Epilepsy (Morte Súbita e Inesperada na Epilepsia)

TCG – Tônico-clônicas Generalizadas

UFG – Universidade Federal de Goiás

VE – Ventrículo Esquerdo

VFC – Variabilidade da Frequência Cardíaca

µg – Micrograma

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Bloqueio do canal de Na⁺ com ação de antiepiléptico. Algumas drogas antiepilépticas (mostradas em texto azul) prolongam a inativação dos canais para Na⁺, reduzindo assim a capacidade dos neurônios de disparar em altas frequências. Note que o próprio canal inativado parece permanecer aberto, mas é bloqueado pela porta de inativação (I). A: Portão de ativação.. **13**
- Figura 2** - Ao bloquear os canais para sódio-dependentes de voltagem, a lamotrigina inibe a liberação de glutamato-dependente das correntes de sódio. Ainda bloqueia o efluxo de potássio e atua em canais para cálcio do tipo N, reduzindo a excitabilidade neuronal **15**
- Figura 3** – Representação dos parâmetros avaliados em cada estimulação barorreflexa por aumentos (A) ou quedas (B) da pressão arterial média (PAM) em todos os grupos experimentais. (a) Perturbação máxima promovidas na PAM. (b) Máxima alteração barorreflexa na frequência cardíaca (FC). (G) Ganho barorreflexo **25**
- Figura 4** – Representação esquemática dos protocolos realizados durante os registros. Registro da sensibilidade barorreflexa (Dia 1). Registro do desafio com isoproterenol (Dia 2). PHE: fenilefrina; NPS: nitroprussiato de sódio; ISO: isoproterenol; Min: minutos **26**
- Figura 5** – Quantificação de frequência de crises epilépticas (média por semana). EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). Média ± EPM. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett **32**
- Figura 6** – Parâmetros cardiovasculares basais dos animais em registro acordado. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). A: PAS (pressão arterial sistólica); B: PAD (pressão arterial diastólica); C: PAM (pressão arterial média); D: FC (frequência cardíaca); E: Número de Arritmias (extra-sístoles). Média ± EPM. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett, *p < 0,05 **34**
- Figura 7** – Traçados eletrocardiográficos representativos de rato Wistar com epilepsia. A: batimentos cardíacos normais. B: batimento ectópico - extrassístole (seta) **35**
- Figura 8** – Resposta da sensibilidade barorreflexa após administração em *bolus* de 5 µg de PHE e 10 µg de NPS. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). A: Índice médio de bradicardia; B: Índice médio de taquicardia. Média ± EPM. ANOVA de um via seguida de pós-teste de Dunnett, *p < 0,05 **36**

Figura 9 - Resposta na frequência cardíaca após administração de ISO 1 µg/kg. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). A: resposta máxima da FC comparada ao período basal; B: variação do aumento da FC (valores em porcentagem). Média ± EPM. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni (A); ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett (B) **37**

Figura 10 – Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) no domínio do tempo. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). A: SDNN (desvio padrão de todos os iRR normais); B: RMSSD (raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre iRR normais adjacentes). Média ± EPM. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett **38**

Figura 11 – Análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). LF: Low Frequency – baixa frequência; HF: High Frequency – alta frequência. A: LF normalizado; B: HF normalizado; C: razão de LF e HF. Média ± EPM. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, *p < 0,05 **39**

Figura 12 – Avaliação da Modulação Autonômica obtida através da análise simbólica da VFC. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). Valores em porcentagem. 0V: modulação simpática; 1V: presença simultânea das modulações simpática e vagal; 2LV e 2ULV: modulação vagal. Média ± EPM. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett **40**

Figura 13 – Índice de massa de estruturas cerebrais e do ventrículo esquerdo (VE). CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). A: índice de massa da Amg; B: índice de massa do Hpc; C: V índice de massa do Hpt; D: índice de massa do Crtx; E: índice de massa do VE. O índice de massa foi calculado pela razão: peso da estrutura (mg) / comprimento da tibia (cm). Média ± EPM. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, *p < 0,05 **41**

Figura 14 – Morfometria dos cardiomiócitos. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). Fotomicrografia representativa de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em corte transversal dos grupos: CNT (A); EP (B); CBZ (C); LTG (D). Coloração: Picrossírius; Objetiva: 40x. (E): Área de secção transversa dos cardiomiócitos. Média ± EPM. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, *p < 0,05 **43**

Figura 15 – Análise do acúmulo de colágeno intersticial no ventrículo esquerdo. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). Fotomicrografias representativas dos grupos: CNT (A); EP (B); CBZ (C); LTG (D). Coloração: Picrossírius; Objetiva: 20x. Fotomicrografias à esquerda: microscopia de luz comum. Fotomicrografias à direita: microscopia de luz polarizada. (E): Porcentagem de colágeno intersticial no ventrículo esquerdo. Média \pm EPM. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett **45**

Figura 16 – Análise do acúmulo de colágeno perivascular no ventrículo esquerdo. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). Fotomicrografias representativas dos grupos: CNT (A); EP (B); CBZ (C); LTG (D). Coloração: Picrossírius; Objetiva: 20x. Fotomicrografias à esquerda: microscopia de luz comum. Fotomicrografias à direita: microscopia de luz polarizada. (E): Porcentagem de colágeno perivascular no ventrículo esquerdo. Média \pm EPM. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$ **46**

Figura 17 – Representação eletrocardiográfica de batimentos cardíacos (intervalos R-R). Tempo entre um batimento e outro expresso em milissegundos (ms) **68**

Figura 18 – (a): Tacograma de um indivíduo saudável (512 batimentos); (b): Espectro paramétrico e decomposição do espectro nas componentes VLF (branco), LF (cinza escuro) e HF (cinza claro) **70**

Figura 19 - Ilustração do método de análise simbólica. A série RR uniformemente distribuída em 6 níveis (de 0 a 5); cada nível foi identificado pelo símbolo (número), e os padrões de comprimento de 3 símbolos foram construídos **71**

Figura 20 - Classificação de padrões. 0V indica padrões sem variação; 1V, padrões com 1 variação; e 2V, padrões com 2 variações **72**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Protocolo de desidratação, diafanização e inclusão tecidual em paraplast **29**

Quadro 2. Protocolo de coloração – Picrosirius **30**

RESUMO

A epilepsia é um dos problemas mais comuns na clínica neurológica, chegando a afetar até 1% da população mundial, além disso, indivíduos com epilepsia possuem uma mortalidade maior que a população geral. Com isso, o interesse em pesquisar alterações cardíacas em pacientes com epilepsia vem sendo crescente, e alguns estudos têm associado o uso de drogas antiepilépticas (DAEs) com distúrbios cardiovasculares. Neste contexto, há hipóteses de que pacientes em uso de DAEs específicas, bloqueadoras de canais para sódio, possuem aumento do risco de doença cardiovascular (DCV). Em nosso estudo, buscamos avaliar as respostas cardiovasculares em ratos epiléticos submetidos à administração crônica de carbamazepina (CBZ) ou lamotrigina (LTG). A divisão dos grupos foi dada em controles sem epilepsia (CNT), epiléticos (EP), epiléticos tratados com CBZ (CBZ) e epiléticos tratados com LTG (LTG). Os parâmetros cardiovasculares basais [Pressão arterial sistólica (PAS); Pressão arterial diastólica (PAD); Pressão arterial média (PAM) e Frequência cardíaca (FC)] foram registrados através de uma canulação da artéria femoral e do implante de eletrodos após sessenta dias de tratamento com DAEs ou veículo [(150mg/kg (v.o.)). Durante o registro os animais foram submetidos a um teste de barorreflexo com administração em *bolus* de fenilefrina (PHE - 5µg) e nitroprussiato de sódio (NPS - 10µg) via canulação da veia femoral e posteriormente submetidos a um desafio com isoproterenol. Através do registro dos parâmetros cardiovasculares basais, também foi analisada a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e o número de extrassístoles. Após todos os procedimentos *in vivo* amostras do coração foram retiradas para análises histológicas do tecido cardíaco. Em nossos resultados os ratos epiléticos apresentaram todos os parâmetros cardiovasculares basais maiores que os parâmetros de animais sem epilepsia. O tratamento com CBZ reduziu a FC de repouso, PAS e PAM em comparação com animais epiléticos sem tratamento. O tratamento com LTG também reduziu a FC de repouso em comparação com o grupo EP. Também observamos que o grupo EP possui área de secção transversa (AST) de cardiomiócitos maior quando comparado aos demais grupos e maior acúmulo de colágeno perivascular em comparação

aos grupos CNT e CBZ. Desta forma, podemos sugerir que o uso crônico de DAEs pode influenciar em respostas cardiovasculares e na microestrutura cardíaca.

ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common problems in the neurological clinic, affecting up to 1% of the world population, moreover, individuals with epilepsy have a higher mortality than the general population. Thus, the interest in investigating cardiac changes in patients with epilepsy has been increasing, and some studies have associated the use of antiepileptic drugs (AEDs) with cardiovascular disorders. In this context, there are hypotheses that patients using specific AEDs, sodium channel blockers, have an increased risk of cardiovascular disease (CVD). In our study, we sought to evaluate cardiovascular responses in epileptic rats submitted to chronic administration of carbamazepine (CBZ) or lamotrigine (LTG). Baseline cardiovascular parameters [Systolic blood pressure (SBP); Diastolic blood pressure (DBP); Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR)] were recorded through cannulation of the femoral artery and electrode implant after sixty days of treatment with AED or vehicle [(150mg / kg (vo)]. The animals were submitted to a baroreflex test with *bolus* administration of phenylephrine (PHE - 5 μ g) and sodium nitroprusside (NPS - 10 μ g) via cannulation of the femoral vein and later submitted to a challenge with isoproterenol. Through the recording of baseline cardiovascular parameters, we also analyzed the heart rate variability (HRV) and the number of extrasystoles. After all procedures *in vivo*, samples of the heart were retained for histological analyzes of cardiac tissue. The division of the groups was performed in controls without epilepsy (CNT), epileptics (EP), epileptics treated with CBZ (CBZ) and epileptics treated with LTG (LTG). In our results the epileptic rats presented all the baseline cardiovascular parameters higher than the parameters of animals without epilepsy. CBZ treatment reduced resting HR, SBP and MAP compared to untreated epileptic animals. Treatment with LTG also reduced resting HR compared to the EP group. We also observed that the EP group had a greater cross-sectional area (CSA) of cardiomyocytes when compared to the other groups and an increased accumulation of perivascular collagen in comparison to CNT and CBZ groups. In this way, we can suggest that chronic use of AEDs may influence cardiovascular responses and cardiac microstructure.

1-INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

Tradicionalmente a epilepsia é entendida como um conjunto de síndromes caracterizadas por crises epilépticas recorrentes que atinge a humanidade desde os seus primórdios. Há manuscritos datados por volta de 2000 a.c. que relatam manifestações de crises, no entanto, estes eventos eram considerados uma doença provocada por causas sobrenaturais (1). Contudo, a partir do século XIX, a epilepsia passou a ser caracterizada, não só pelo fenômeno das crises, mas também como uma doença de origem cerebral, e com os avanços de estudos relacionados ao assunto, sua definição consensual mais recente passou a ser a seguinte: alteração do cérebro caracterizada por uma predisposição duradoura de gerar crises epilépticas e pelas consequências neurológicas, cognitivas, fisiológicas e sociais desta condição, requerendo pelo menos uma crise epiléptica (2).

Ultimamente a epilepsia também tem sido descrita como síndrome, sendo o termo “síndrome epiléptica” referido a um grupo de características clínicas que ocorrem de forma contígua, como tipo(s) similar(es) de crise epiléptica, idade de início da epilepsia, achados eletroencefalográficos, fatores desencadeantes, genética, prognóstico e resposta às drogas antiepilépticas (DAEs) (3).

A recorrência das crises ocorre devido a paroxismos transitórios de descargas neuronais incontroláveis, que podem ser causados por uma grande variedade de fatores. Embora as crises estejam relacionadas a várias patologias, nem todos os doentes com uma doença cerebral têm epilepsia. Além disso, a definição de epilepsia requer a ocorrência de pelo menos uma crise epiléptica, não sendo uma entidade nosológica única, mas advindo de várias condições diferentes que ocasionam disfunção cerebral (4).

Dentre os fatores de risco que podem originar a epilepsia, os mais comuns são lesão cerebral por traumas, doenças cerebrovasculares, tumores cerebrais, malformações do desenvolvimento cortical, herança genética e infecções do SNC (5). Em relação aos países com poucos recursos, infecções

endêmicas, como malária e neurocisticercose, parecem ser os principais fatores de risco (6).

Uma crise epilética é caracterizada por um evento desencadeado por descargas neuronais, geralmente excitatórias, com potenciais de ação de alta frequência, e sincronizações anormais e excessivas da atividade neuronal que estão localizadas predominantemente no córtex cerebral. Estas crises ocorrem de forma intermitente, sendo geralmente autolimitadas e se apresentam como manifestações clínicas recorrentes, cujos episódios habitualmente são breves (de segundos a minutos) causando a interrupção da atividade cerebral normal de forma focal ou difusa (7). Podem ser observadas em diversas doenças que envolvem o sistema nervoso surgindo espontaneamente ou sendo desencadeadas por febre, distúrbio eletrolítico, intoxicação, doenças degenerativas ou alterações vasculares (2).

As crises epiléticas podem se apresentar com características distintas, com isso, podem ser subdivididas em três categorias: focais (também conhecidas como parciais), generalizadas e espasmos epiléticos. A International League Against Epilepsy (ILAE) descreve que as crises são dinâmicas e evolutivas, e os pacientes apresentam variações no padrão da crise epilética, dependendo do grau e da maneira de propagação da descarga elétrica (8). Deste modo, doentes com crises epiléticas parciais simples podem evoluir para crises parciais complexas, e crises parciais simples ou complexas podem evoluir para crises tônico-clônicas secundariamente generalizadas. No entanto, independentemente da classificação utilizada, tanto as epilepsias focais como as generalizadas podem ser divididas em três categorias: idiopáticas (ou genéticas), sintomáticas (aquelas relacionadas com a lesão estrutural do sistema nervoso central) e as de causa indeterminada (criptogênicas) (9).

Nas crises focais um conjunto de neurônios de parte do encéfalo sofre uma disfunção temporária, podem ocorrer com ou sem perda da consciência, podendo uma crise sem perda de consciência progredir para uma crise com perda de consciência. Já as crises generalizadas, envolvem simultaneamente os dois hemisférios cerebrais abrangendo uma área mais externa e são caracterizadas por sintomas motores que envolvem todo o corpo, mesmo que de forma ligeiramente assimétrica. (10).

As manifestações clínicas de uma crise focal dependem da área do córtex envolvida. Por exemplo, crises com foco no lobo occipital podem apresentar fenômenos visuais; as crises com foco no giro pré-central podem apresentar ritmo clônico ou atividade motora tônica; já crises com foco no giro pós-central podem estar acompanhadas de sintomas sensoriais, tais como parestesias. Quando a consciência é prejudicada durante um ataque focal, ou seja, o paciente torna-se incapaz de responder a estímulos verbais ou táteis, a crise é classificada como discognitiva (também conhecida como crise parcial complexa). Crises com foco no lobo temporal são frequentemente discognitivas (7).

No que se referem a crises generalizadas, seus principais subtipos incluem crise de ausência, crise tônico-clônica, crise mioclônica e crise atônica. A crise de ausência envolve um olhar fixo para o infinito, sem resposta a estímulos verbais, podendo estar acompanhada de piscar dos olhos ou de concordância com a cabeça. Diferentemente, a crise tônico-clônica consiste em movimentos convulsivos bilateralmente simétricos (enrijecimento seguido por espasmos) de todos os membros, com comprometimento da consciência. Já na crise mioclônica ocorrem inesperados e breves abalos musculares, que não estão associados a qualquer perturbação óbvia da consciência e que podem ser confinados a uma extremidade ou generalizados. A crise atônica envolve a perda do tônus corporal, muitas vezes resultando em uma queda súbita da cabeça (7).

Os espasmos epiléticos são representados pela súbita extensão ou flexão das extremidades, que duram alguns segundos e que, em seguida, repetem-se em conjunto. A origem de tais espasmos é incerta, mas sabe-se que podem ocorrer em qualquer idade. Quando se iniciam no primeiro ano de vida compreendem uma síndrome chamada de espasmos infantis (Síndrome de West) (8).

Essas classificações auxiliam na confirmação da epilepsia e são essenciais para direcionar um tratamento mais adequado. Alguns dos objetivos principais do diagnóstico da epilepsia consistem na avaliação se as crises são de natureza epilética e não de outro tipo, na classificação correta das crises e do tipo de epilepsia e, em determinar se os dados clínicos encaixam-se em uma determinada síndrome epilética e se possível, identificar a etiologia.

Então, para se diagnosticar a epilepsia são necessários inúmeros fatores tais como, a avaliação da história clínica, descrição da atividade convulsiva por quem a presenciou, exames físicos e achados encefalográficos, visto que não existe um teste absoluto que confirme ou negue a epilepsia (11).

Como as crises epiléticas se manifestam como alterações físicas ou comportamentais, incluindo mudanças na atividade elétrica do cérebro e variações da frequência cardíaca (FC), eletroencefalograma (EEG), e no eletrocardiograma (ECG) são utilizados para avaliação de pacientes com epilepsia (12). A FC em pacientes com epilepsia, por exemplo, é medida antes da crise (pré-ictal), durante a crise (ictal), entre crises (inter-ictal), e após a crise (pós-ictal) para identificar uma variedade de condições, tais como arritmia cardíaca e outras anormalidades de condução (13). Com isso, os dados de ECG são sinais clínicos de extrema importância para a detecção de anomalias cardíacas e ultimamente tem sido uma ferramenta para avaliar efeitos das DAEs sobre o sistema nervoso autônomo (SNA).

O conhecimento dos eventos básicos da epilepsia que foi alcançado nos últimos anos sugere que o fenômeno epilético envolve diversas alterações neurobiológicas, principalmente sobre os canais iônicos sensíveis à voltagem (particularmente canais para sódio e de cálcio), a transmissão inibitória (mediada pelo ácido γ -aminobutírico, GABA) e a transmissão excitatória (mediada pelo glutamato, Glu) (14). Com isso, têm-se uma definição de três grandes categorias em termos de mecanismo de ação das DAEs: modulação dos canais iônicos, potenciação da transmissão inibitória e inibição da transmissão excitatória. No entanto, como muitos dos antiepiléticos possuem múltiplos mecanismos de ação, a classificação dos diversos fármacos se faz normalmente em função do principal mecanismo de ação que apresentam (15).

Apesar do tratamento medicamentoso da epilepsia ser uma das terapias de maior sucesso em neurologia, ter uma segurança diagnóstica é importante antes de iniciá-lo, pois é um tratamento geralmente prolongado e que envolve riscos. Portanto, para iniciar um tratamento antiepilético vê-se necessário uma investigação mínima etiológica através de detalhada anamnese, exames físico e neurológico, além de exames de imagem e uma investigação laboratorial quando há suspeita de doença sistêmica (10).

A relevância de um diagnóstico apropriado pode ser observada na afirmação da Organização Mundial da Saúde (OMS) de que, a epilepsia é a segunda causa mais frequente de procura por atendimento nos centros neuropsiquiátricos, sendo considerada uma doença de saúde pública, já que ocasiona uma elevada taxa de mortalidade por suicídio e morte súbita (16).

No que se refere à mortalidade, os pacientes com epilepsia possuem em média 2-3 vezes maior índice do que a população geral (17). Esse risco ocorre principalmente devido a traumatismos, queimaduras, afogamentos, suicídio e morte súbita (18). Além disso, a epilepsia tem sido associada a um risco mais elevado de acontecimentos relacionados com doença cardiovascular (DCV) (19).

1.2 – Epidemiologia

A epilepsia constitui uma das mais comuns desordens neurológicas, com ampla distribuição, chegando a afetar até 1% da população mundial (20). Sua incidência média estimada em metanálise é de 43,4 por 100.000 pessoas-anos, em países desenvolvidos, e de 68,7 por 100.000 naqueles em desenvolvimento (21). Trata-se de uma condição crônica, com prevalência estimada de 5 a 10 casos por 1.000 habitantes nos países desenvolvidos e, ainda, maior nos em desenvolvimento, atingindo estimativa de 14 a 57 casos por 1.000 habitantes. Esta maior incidência de epilepsia nos países em desenvolvimento deve-se ao fato de que nesses países há um maior risco de infecções cerebrais e um sistema de saúde inadequado (22). No Brasil, alguns poucos estudos epidemiológicos sobre epilepsia foram realizados, neles foram encontradas prevalências de 11,9/1.000 habitantes para epilepsia, com taxas de prevalência de 16,5 para epilepsia ativa (pacientes que apresentem crises ou necessitem tratamento crônico para controle de crises) e 20,3/1000 habitantes para epilepsia inativa (pacientes que entraram em remissão) (20).

A causa mais comum de morte em adultos jovens com epilepsia é a morte súbita e inesperada nas epilepsias (SUDEP) (23). As comparações de estimativas de incidência da SUDEP são difíceis por decorrência da utilização de diferentes definições de SUDEP, pela variação da população de origem e dos métodos de apuração dos casos, além disso, nem todos pacientes

possuem exames *post mortem*. Com isso, o que se tem em dados é que o risco de morte súbita na população em geral é da ordem de um a dois por 10.000 pessoas por ano, já o risco na população com epilepsia é de 3 a 15 por 10.000 pessoas por ano (24).

Devido à dificuldade de investigações sobre SUDEP por causa de diferentes definições, em 1996 especialistas propuseram uma definição para tais episódios, no congresso internacional sobre epilepsia e morte súbita. Portanto, SUDEP têm por definição uma morte súbita, inesperada, testemunhada ou não, de pacientes com epilepsia que apresentaram mortes não traumáticas e por não afogamento, com ou sem evidências de uma crise e excetuando *status epilepticus* (SE), documentado, em que exames pós-morte não revelaram uma causa de morte toxicológica ou anatômica (25).

Dados sugerem que o risco de morte súbita esteja relacionado com a gravidade da epilepsia, e parece que a falta do controle das crises ou fatores a ela relacionados estejam mais ligados ao maior risco (22). Estudos epidemiológicos sugerem que em torno de 70% de pacientes em desenvolvimento de epilepsia entrarão em remissão e os 30% demais, serão refratários ao tratamento atual e continuarão a ter crises (26,27). Também têm sido relatadas as diferenças de idade e de gênero, sendo as mulheres possuidoras de uma maior taxa de prevalência de SUDEP, mas geralmente ocorrendo mais tarde na vida do que em homens (idade média de 52 anos nas mulheres e 38 anos nos homens) (18). Ainda não se sabe se essa diferença de gênero está relacionada com alterações hormonais como, por exemplo, a menopausa, no entanto, alguns autores opinam de forma diferente, relatando que crises epiléticas não provocadas são significativamente maiores em homens do que em mulheres (28). Contudo, a epilepsia não faz distinção entre raças, faixas etárias, situações financeiras ou gênero, podendo acometer qualquer indivíduo.

Os mecanismos patofisiológicos da SUDEP ainda são desconhecidos. Na tentativa de identificação desses mecanismos a principal hipótese sugere que há uma sobreposição de alterações cardíacas, respiratórias e autonômicas (29,30,31). E apesar do mecanismo de SUDEP não estar bem esclarecido, estudos tem citado potenciais fatores de risco para este fenômeno, e dentre estes fatores estão: idade, início precoce da epilepsia, duração da epilepsia,

tipo de crise, principalmente tônico-clônicas generalizadas (TCG), frequência das crises e terapia com drogas antiepilépticas (DAEs), incluindo politerapia e mudanças de doses frequentes e crises não controladas, principalmente na Epilepsia de Lobo Temporal ELT (32,33).

1.3 - Epilepsia do Lobo Temporal

A forma mais frequente de epilepsia em adultos e a mais comumente refratária à medicação é a ELT, acometendo cerca de 40% destes pacientes (34). Este tipo de epilepsia está associado a alterações do complexo amigdalóide, formação do hipocampo e córtices entorrinal e perirrinal. Uma característica frequente da ELT é a alteração dos estados de memória devido ao envolvimento frequente da formação do hipocampo (35,36).

Em relação à refratariedade na epilepsia, sua definição é dada como a resistência a pelo menos duas DAEs empregadas de forma “correta” em um período de dois anos. Em 2010, a ILAE reformulou a semântica de refratário, resistente a fármacos ou medicamento intratável para “resistente a drogas” (37). Cerca de 75% dos pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) são considerados como tendo epilepsia resistente a fármacos (38). 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.

Atualmente a ELT é subdividida em critérios que se baseiam na origem e semiologia das crises, classificada como mesial ou neocortical (lateral). Dentre essas a epilepsia do lobo temporal mesial é a mais comum abrangendo cerca de 60% de todos os casos de ELT, envolvendo principalmente estruturas límbicas como o córtex entorrinal, neocórtex temporal lateral, tálamo medial, lobo frontal inferior, amígdala e hipocampo (35,36). Podem ser encontrados outros substratos que dão origem às crises, como tumores, lesões vasculares, inflamatórias ou infecciosas, mas o maior foco de atenção para a epileptogênese nesse contexto são as estruturas mesiais do lobo temporal encontrada na ELTM (39).

A esclerose mesial temporal caracteriza-se por uma esclerose hipocampal associada a um grau variável de alterações patológicas na amígdala e giro parahipocampal, incluindo graus variados de perda neuronal e gliose no setor CA1, CA4, CA3 (em ordem decrescente de importância), com relativa preservação da integridade neuronal no setor CA2 (40). Outras características estão associadas à esclerose hipocampal, tais como reorganização sináptica e brotamento de fibras musgosas, dispersão das células granulosas do giro denteado, alterações extra-hipocampais como perda neuronal da amígdala e alterações da substância branca do lobo temporal (41,42).

Um evento epiléptico típico de ELTM é a presença habitual de uma aura característica, seguida de olhar fixo com parada de atitude, perda de contato com o meio e automatismos. Além dessas características, podem ocorrer sintomas motores, confusão pós-ictal acentuada e generalização secundária, menos frequente nos pacientes que fazem uso correto de Drogas Antiepilépticas (DAEs) (38,39,41,42).

As auras que antecedem a perda de contato com o meio podem ser do tipo mal estar epigástrico ascendente associado a sensações olfativas e ou gustativas, podendo também ocorrer sensações inespecíficas, sintomas psíquicos, como sensação de medo, estado de sonho, situações experienciais, sensação de “déjà vu” ou “jamais vu”, alterações emocionais, afetivas e também da senso-percepção e autonômicos, ocorrendo palidez, sudorese, náusea, arritmias e dilatação pupilar (43-46).

1.4 - Alterações Cardiovasculares na Epilepsia

Alteração do controle modulatório do sistema cardiovascular frente às crises epiléticas já são bem evidenciados. Vários estudos relatam alterações do ritmo cardíaco durante, antes e após as crises epiléticas, evidenciadas pela presença de taquiarritmia e bradiarritmia, embora a última seja menos frequente. Além do ritmo, alterações do traçado eletrocardiográfico, como alargamento do segmento QT e infradesnivelamento do segmento ST, também são relatadas, sendo mais frequentes em pacientes com epilepsia do lobo

temporal. Porém um estudo mais detalhado dos mecanismos responsáveis por essas alterações, em seres humanos, é limitado devido a questões éticas e metodológicas (29,31,47-50).

Estudos em pacientes com epilepsia, que morreram de forma repentina e inesperada revelou a presença de patologias cardíacas que poderiam ser responsáveis por suas mortes. Além disso, foram sugeridos danos cardíacos secundários, uma vez que encontraram no ECG de pacientes com crises sinais de isquemia, anomalias de condução e ritmo cardíaco, elevação de troponina e creatina quinase (CK-MB), além da presença de elevado peptídeo natriurético cerebral (BNP). Do ponto de vista morfológico já foram demonstradas 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 (17,51).

Assim, alterações cardíacas na epilepsia são comuns e vão desde mudanças na variabilidade da frequência cardíaca (VFC) para parada sinusal ictal, e do encurtamento e alargamento do intervalo QT para fibrilação atrial. Diversos trabalhos sugerem que as mudanças na VFC na epilepsia resultam das alterações autonômicas interictais, bem como das próprias descargas autonômicas que ocorrem durante as crises. Em pacientes com ELT há uma significativa redução da VFC quando comparados com a população em geral, e esta redução é mais acentuada durante a noite. A redução da VFC na epilepsia é associada, principalmente, com a predominância do tônus simpático ou com o aumento relativo da modulação simpática (através da diminuição do tônus parassimpático). O aumento da influência simpática cardíaca é potencialmente pró-arrítmica e o aumento crônico do tônus simpático pode conduzir a alterações em longo prazo na inervação simpática, favorecendo assim, o risco de anomalias na repolarização cardíaca. Dessa forma, a redução da VFC aumenta o risco de eventos cardíacos e por isso, acredita-se que a VFC possa estar envolvida nos mecanismos fisiopatológicos da SUDEP (53-59).

A associação entre epilepsia e doença cardiovascular (DCV) não está claramente definida, entretanto, alguns fatores de risco para DCV como, falta de exercício físico, fumo, hábitos alimentares pouco saudáveis e dislipidemias

são mais prevalentes em pacientes com epilepsia quando comparados aos indivíduos sem epilepsia. Neste contexto, tem sido sugerido que drogas antiepilépticas também podem diferencialmente influenciar o risco de DCV em pacientes com epilepsia, sendo as de maior associação as DAEs bloqueadoras de canais para sódio, em que, estudos revelam um aumento do risco de DCV de quase três vezes. Em comparação, DAEs sem propriedade bloqueadora de canais para sódio não apresentaram associação significativa com DCV. Além disso, uma relação entre epilepsia, DAE e arritmias cardíacas, também foi proposta como responsável pela SUDEP (19,30,60,61).

1.5 - DAEs e Alterações Cardiovasculares

O tratamento da epilepsia tem por objetivo propiciar uma melhor qualidade de vida para o paciente, pelo alcance do controle de crises, com um mínimo de efeitos adversos. A principal forma de terapia adotada é o tratamento farmacológico com DAEs, entretanto, outras modalidades terapêuticas podem ser escolhidas para pacientes que apresentam refratariedade ao tratamento medicamentoso. Entre estes, o tratamento cirúrgico para remoção do foco epileptiforme cortical ou para interrupção desse foco possui alta eficácia, no entanto, antes da cirurgia é preciso uma investigação cuidadosa para que o paciente evolua com ausência de crises e de déficits neurológicos. Para pacientes com epilepsia farmacorresistente sem indicação de cirurgia ressectiva, a neuromodulação por terapia de estimulação do nervo vago é apontada como eficaz e de baixo risco, indicada para crises focais, multifocais ou generalizadas. A dieta cetogênica ou dieta Atkins modificada também são alternativas terapêuticas para o tratamento de epilepsias refratárias, além da piridoxina (vitamina B6) e corticosteroides como o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que são utilizados principalmente no tratamento da Síndrome de West e epilepsias graves da infância (52,64).

A identificação do tipo de crise e da síndrome epiléptica do paciente é importante, uma vez que os mecanismos de geração e propagação de crise diferem para cada situação, e as DAEs que são a principal escolha terapêutica, agem por diferentes mecanismos que podem ou não ser favoráveis ao tratamento (52). Portanto, a decisão de iniciar um tratamento anticonvulsivante

baseia-se fundamentalmente no risco de recorrência de crises, consequências da continuação de crises para o paciente e eficácia e efeitos adversos do fármaco escolhido. Assim, selecionar o medicamento mais eficaz para o tipo de crise em questão, é o princípio mais importante na escolha da DAE que será utilizada (64).

Atualmente, para o tratamento de crises focais em geral a carbamazepina (CBZ) tem sido o fármaco de primeira escolha, e para crises generalizadas o valproato. Nos últimos anos, novas DAEs foram apresentadas com espectros mais amplos com eficácia em crises focais e generalizadas, representando uma alternativa adequada para tratamento de pacientes que apresentam efeitos adversos intoleráveis com as DAEs tradicionais. Entre estes fármacos mais recentes inclui-se a lamotrigina (LTG), que por seu melhor perfil farmacocinético, é indicada para pacientes com comorbidades como alterações hepáticas e renais, obesidade, cefaleia e transtornos do humor. Nestes casos sua indicação deveria ser considerada em monoterapia e algumas vezes, como primeira opção terapêutica. Várias DAEs da nova geração apresentam melhores perfis de tolerabilidade e menor potencial de interação medicamentosa, o qual tem expandido as oportunidades para individualizar o tratamento com DAE, visando melhorar a eficácia e minimizar o risco de efeitos tóxicos (64).

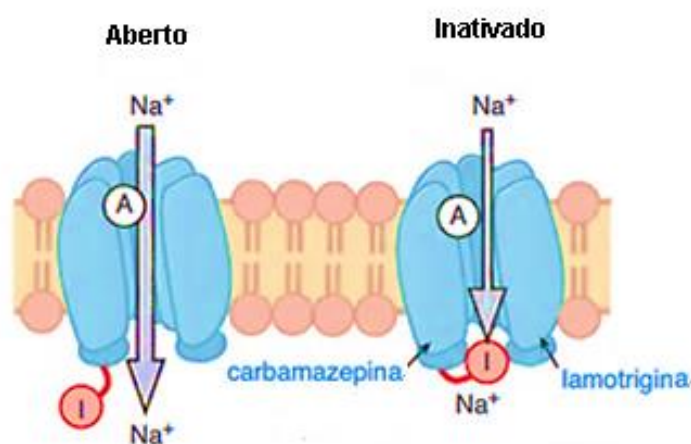
Como as DAEs podem possuir mais de um mecanismo de ação, entender como estes fármacos atuam e que alterações podem desencadear cronicamente, são temas ainda muito discutidos. Como referido anteriormente, estudos sugerem que DAEs podem diferencialmente influenciar no risco de DCV em pacientes com epilepsia. Neste contexto, evidências também demonstram que tanto epilepsia quanto o uso de DAEs estão associados com o risco aumentado de morte súbita cardíaca, sendo as de maior associação as DAEs bloqueadoras para canais para sódio. Com isso, o interesse nas alterações cardíacas em pacientes com epilepsia e sua relação com SUDEP vêm sendo crescente, e alguns estudos associaram DAE com distúrbios na condução cardíaca e arritmias, onde há a sugestão de que pacientes em uso de drogas específicas como CBZ ou LTG possuem um maior risco à morte súbita nas epilepsias. A relação das DAE com o risco de SUDEP tem sido avaliada em alguns aspectos, como: dosagens e mudanças frequentes destes

fármacos, porém há divergências nos resultados, sendo necessárias maiores investigações (19,60,62,63,64).

A CBZ é um composto tricíclico, derivado iminostilbeno, estrutural e farmacologicamente semelhante aos antidepressivos tricíclicos (imipramina, clorpromazina e maprotilina) e, compartilha também algumas características estruturais com outros anticonvulsivantes como a fenitoína, clonazepam e fenobarbital. Seu metabolito ativo, carbamazepina-10,11-epóxido (CBZ-E), é responsável pelos seus efeitos cognitivos e sua eficácia para crises parciais e secundariamente generalizadas em crianças e em adultos, com excelente perfil de tolerabilidade. Por ser uma substância instável, deve ser protegida da umidade e do calor, o que pode resultar numa redução de até 50% da respectiva biodisponibilidade. É um pó cristalino branco a esbranquiçado, livremente solúvel em diclorometano e propilenoglicol, moderadamente solúvel em etanol (95%) e em acetona e praticamente insolúvel em água, o que limita a sua administração, portanto, a maioria dos estudos de desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo CBZ é focada na administração oral. É um composto lipofílico, por isso, a sua absorção gastrointestinal é lenta e errática e varia de paciente para paciente (26,68,69).

A CBZ induz o seu próprio metabolismo, de modo que a meia-vida plasmática pode ser consideravelmente reduzida após a administração repetida. Sua metabolização é quase que inteiramente pelo metabolismo hepático, em que, as maiores vias de biotransformação, consecutivas ou em paralelo, são via epóxido-diol, hidroxilação aromática e conjugação. Nos doentes com epilepsia 30-60% da CBZ é oxidada a CBZ-E, pelo sistema do citocromo P450, e a depuração desse metabolito ocorre até três vezes mais rápida que a depuração da CBZ. Após a absorção, a CBZ distribui-se rapidamente por todos os tecidos e, aproximadamente 75% ligam-se às proteínas plasmáticas. As concentrações plasmáticas máximas ocorrem geralmente 4 a 8 horas após a ingestão oral, mas podem ocorrer até 24 horas depois, especialmente após administração de grandes doses e, sua concentração no LCR parece ser semelhante à concentração do fármaco livre no plasma. A CBZ-E é metabolizada em compostos inativos que são eliminados na urina (26,70,71,72,73).

Seu principal mecanismo de ação é o bloqueio dos canais para sódio dependentes de voltagem (Figura 1) durante o disparo neuronal rápido, repetitivo e sustentado, e a prevenção da potenciação pós-tetânica. Através da inibição de potenciais de ação, a CBZ exerce potencial de ação neuronal GABAérgico, inibindo então vários sistemas de neurotransmissão passando a funcionar como um depressor do SNC. Estes mecanismos associados a diminuição da descarga de glutamato estabilizando as membranas neuronais, parecem estar ligadas aos seus efeitos antiepiléticos (71,72,74).



Goodman & Gilman's, 12th ed., 2011

Figura 1 - Bloqueio do canal para Na^+ com ação de antiepilético. Algumas drogas antiepiléticas (mostradas em texto azul) prolongam a inativação dos canais para Na^+ , reduzindo assim a capacidade dos neurônios de disparar em altas frequências. Note que o próprio canal inativado parece permanecer aberto, mas é bloqueado pela porta de inativação (I). A: Portão de ativação.

Em 1974, a CBZ foi inicialmente aprovada nos EUA como agente antiepilético, posteriormente tornou-se uma das melhores drogas anticonvulsivantes, causando poucas alterações psicológicas e efeitos comportamentais em comparação às drogas então utilizadas. Atualmente, é considerada um dos principais agentes para o tratamento das crises parciais e tônico-clônicas e é, portanto, um composto de propriedades anticonvulsivantes e antinociceptivas. Este agente anticonvulsivo é uma das mais prescritas drogas para distúrbios neurológicos, tais como: síndromes dolorosas, distúrbios psiquiátricos e epilepsia, sendo o principal antiepilético (de primeira escolha) de primeira linha para o tratamento das crises parciais e crises generalizadas tônico-clônicas. Somente no Brasil este medicamento movimentava cerca de US\$

23 milhões por ano, o Instituto de Tecnologia em Fármacos da Fiocruz, produz 43 milhões de comprimidos de carbamazepina anualmente (26,66,67).

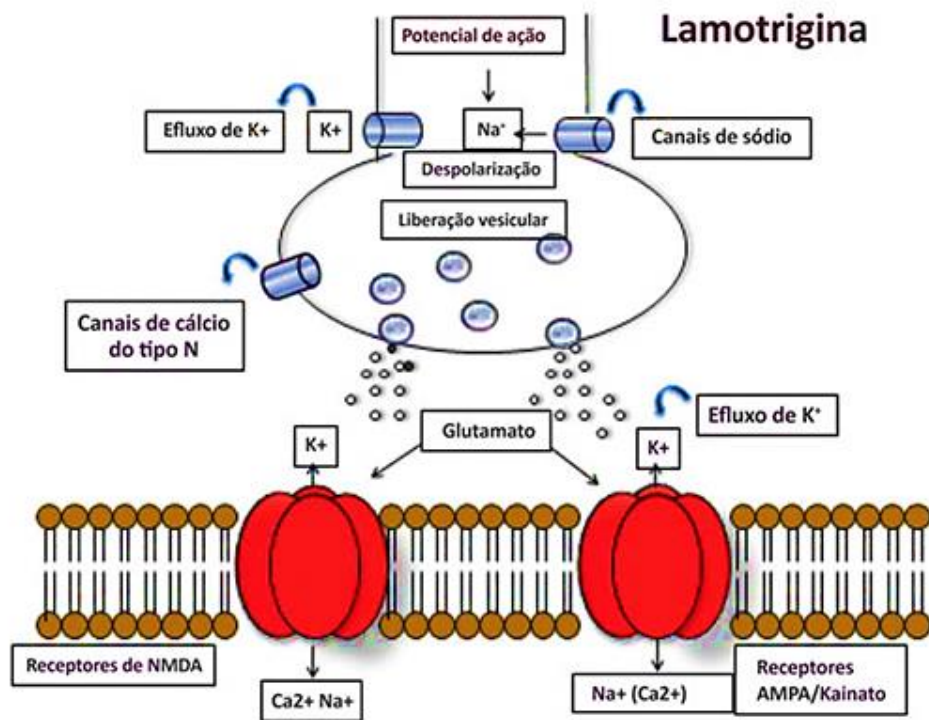
Outro fármaco conhecido pelas suas propriedades antiepilépticas é a LTG, uma droga relativamente não sedativa, com poucos problemas em longo prazo sendo uma boa alternativa para crises de início parcial com ou sem generalização secundária e em crises tônico-clônicas generalizadas primárias. Este fármaco foi aprovado para o tratamento de crises epilépticas no Brasil em Junho de 1992, e atualmente está disponível em aproximadamente 130 países. Tem se mostrado muito eficaz, principalmente em doses maiores, como de 200mg a 600mg, no entanto, o uso dessas dosagens torna o tratamento caro (75-77).

LTG é o nome dado à 3,5-diamin-6-(2,3-ciclorofenil)-1,2,4-triazina. É um pó branco, quimicamente estável, solúvel em água (<1mg/mL) e em etanol (aproximadamente 1mg/mL). Possui rápida e quase completa absorção, com 98% de biodisponibilidade após a administração oral e apresenta baixa ligação com proteínas plasmáticas (55%) em que, sua concentração plasmática máxima é alcançada entre 1,4 a 4,8 horas após a administração. Seu volume de distribuição varia de 0,9 a 1,3 L/kg e possui uma meia-vida de aproximadamente 26 horas, sendo aproximadamente 94% eliminada pela urina, e 10% como forma inalterada (78-80).

A metabolização da LGT é via hepática pelo processo de conjugação com ácido glucurônico, via glucuronosiltransferase uridina difosfato (GUD). Apesar da LTG possuir uma farmacocinética linear, na prática clínica a concentração plasmática apresenta ampla variabilidade interindividual indicando que a LTG não provoca autoindução. Embora seu *clearance* possa ser alterado pela administração concomitante de outros medicamentos, a LTG não interfere sobre o metabolismo de outras DAE (26,81).

LTG atua principalmente por bloqueio dos canais para íons sódio dependente de voltagem neuronal, mas a sua ação anticonvulsivante é devida à modulação recíproca liberação de glutamato e GABA. Outros efeitos observados com a lamotrigina foram, a inibição de canais para cálcio voltagem-dependentes e a capacidade de reduzir a liberação de óxido nítrico. Estudos recentes relataram que LTG também regula os receptores 5HT1A pós-sinápticos em que apresenta um efeito antidepressivo, e que inibe os

receptores de acetilcolina com a mesma afinidade que para os canais para sódio. Outro efeito descrito é sobre a excitabilidade de dendritos de neurônios piramidais, através de uma ação direta na corrente de cátions ativada pela hiperpolarização. A lamotrigina também pode inibir as correntes de cálcio em canais do tipo N e tipo L e aumentar efluxo de K^+ em correntes repolarizantes (76,82-85).



YACUBIAN, Neuropsiquiatria, 2014

Figura 2 - Ao bloquear os canais para sódio-dependentes de voltagem, a lamotrigina inibe a liberação de glutamato-dependente das correntes de sódio. Ainda bloqueia o efluxo de potássio e atua em canais para cálcio do tipo N, reduzindo a excitabilidade neuronal.

Apesar do mecanismo de ação da LTG ser semelhante ao de outras DAE como a CBZ, elas diferem entre si em outros aspectos. Assim, a seletividade para os canais para sódio surgiu como uma possível explicação para a diferença de atividade e de efeitos adversos observados entre elas. É provável que a LTG exiba uma sensibilidade diferente para as várias subunidades alfa dos canais para sódio, podendo atuar seletivamente em neurônios que sintetizam glutamato e aspartato (83).

Apesar dos achados de estudos anteriormente citados, mecanismos que comprovem a possível associação de DAEs e alterações no sistema cardiovascular ainda devem ser melhores esclarecidos. Com isso, é necessário

aprofundar cada vez mais na investigação de parâmetros cardiovasculares em modelos experimentais de epilepsia e o tratamento crônico com DAEs.

1.6 – Modelo de Indução de Epilepsia pela Pilocarpina

Estudos sobre mecanismos responsáveis pela epilepsia e a sua associação com outras patologias muitas vezes são limitados em seres humanos devido a questões éticas e metodológicas. Uma vez que a epilepsia apresenta crises recorrentes e na maioria das vezes ocorrem de forma espontânea, modelos crônicos de epilepsia possuem uma grande importância por mimetizarem mais adequadamente à condição humana, servindo, portanto, para maior caracterização fisiopatológica e para avaliação de drogas antiepilépticas. Dentre esses modelos experimentais, os que mais se destacam nesse tipo de estudo são realizados a partir do uso de quimioconvulsivantes, principalmente o ácido caínico e a pilocarpina (PILO) o qual mimetiza a condição humana de ELT. Se inclui no processo de indução de epilepsia em animais, uma lesão inicial que afeta o hipocampo e/ou o lobo temporal, um período de latência entre a lesão e a ocorrência de crises espontâneas, a manifestação crônica de crises espontâneas e alterações histopatológicas consideradas características da ELT (86-89).

O modelo experimental da ELT através da injeção sistêmica de PILO, foi primeiramente descrito por Turski et al (1983). A administração da PILO em altas doses foi capaz de produzir uma sequência de alterações comportamentais e eletroencefalográficas que progressivamente culminaram em um estado de mal epiléptico (*status epilepticus*) límbico. A PILO que é um agonista colinérgico muscarínico, quando administrado, induz além do quadro de alterações comportamentais, manifestação de crises motoras límbicas que surgem aos 15-30 minutos após injeção, e podem perdurar por horas - *status epilepticus* (SE), caracterizando o período agudo do modelo. O animal que sobrevive ao quadro agudo passa por um período latente livre de crises comportamentais, que tem duração média de 14 dias (período silencioso), que termina no momento em que o animal apresenta a primeira crise espontânea.

Com isso, o modelo de epilepsia induzida pela PILO pode ser dividido em três períodos distintos de acordo com as alterações comportamentais e eletrográficas provocadas pela administração desse potente agonista muscarínico. São eles: Período agudo – que evolui progressivamente para o estado de mal epiléptico (SE) e dura 24 horas, se não interrompido por bloqueio farmacológico; Período silencioso – com progressiva normalização comportamental e eletroencefalográfica, e que varia de 4 a 44 dias; Período crônico – caracterizado pela presença de crises espontâneas e recorrentes que persistem por toda vida do animal. (55)

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 variável, normalmente não ultrapassando 60 segundos. Do ponto de vista estrutural, o hipocampo é a região cerebral mais sensível aos efeitos neuropatológicos desencadeados pela ação epileptiforme resultante da ativação colinérgica. (52,56,57)

As crises que ocorrem durante o SE na fase aguda diferem das crises espontâneas posteriores ao SE, estando na base desse fato a referida reorganização dos circuitos neuronais após a ocorrência do SE. As alterações histológicas e moleculares encontradas no modelo da PILO são muito similares às observadas em pacientes com ELT, com a vantagem de que podemos obtê-las em semanas enquanto nos pacientes demoram anos. (123)

A capacidade da PILO de induzir o SE, que é uma condição caracterizada por uma crise epiléptica prolongada ou repetida em intervalos curtos, depende da ativação do receptor muscarínico do subtipo M1, provocando um desequilíbrio entre as transmissões excitatórias e inibitórias. Com isso, a ocorrência do SE induzido pela pilocarpina pode ser bloqueado pela administração sistêmica de um antagonista muscarínico. 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 oferecendo suporte para a sugestão de que, após o início por receptores M1, as crises são mantidas pela ativação do receptor N-metil D-Aspartato (NMDA). (58,59,60)

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. As células emitem colaterais estabelecendo novas conexões sinápticas aberrantes gerando um rearranjo sináptico dos pacientes com ELT. Esta condição foi inicialmente descrita no giro denteado tanto em humanos quanto em animais epiléticos. Além disso, as fibras musgosas do giro denteado emitem colaterais para seu próprio campo dendrítico, resultando em um circuito excitatório recorrente. Esta característica não se restringe ao giro denteado, mas também para CA1 e outras e outras áreas extra hipocampais contribuindo para a cronicidade das crises. (61,62,63)

Estudos sugerem que o efeito epileptogênico desse agente colinérgico resulta de descargas originadas em neurônios do hipocampo devido ao bloqueio das correntes de potássio transmembranares, o que explicaria a maciça ativação dos neurônios do hipocampo durante o SE induzido pela PILO, *status* esse que conduz à morte celular e reorganização sináptica do circuito hipocampal, provocando mudanças epileptogênicas permanentes. Há também a sugestão de que, a ativação de receptores M1 pela PILO resulta em alterações nas correntes tanto de Ca^{2+} quanto de K^{+} e aumenta a excitabilidade neuronal, dando início as crises epiléticas. Este aumento da excitabilidade neuronal promoveria elevada liberação de glutamato, que é o responsável pela manutenção das crises e indução do estado de mal epilético. O glutamato, agindo em receptores NMDA e AMPA, aumenta ainda mais o influxo de Ca^{2+} nos neurônios, o que irá provocar excitotoxicidade e morte celular por proteólise e lipólise da membrana plasmática. A lesão neuronal não é, portanto, decorrente de efeito tóxico da PILO, mas sim do efeito excitotóxico envolvendo receptores de glutamato e influxo de íons cálcio. (55)

São numerosas as evidências que confirmam a validade do modelo da PILO como ferramenta adequada para a investigação dos mecanismos patofisiológicos da ELT. Portanto, a utilização desse modelo no estudo dos mecanismos que tornam o cérebro cronicamente epilético e nas consequências que as crises epiléticas trazem para o organismo é de extrema relevância.

2-OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar respostas cardiovasculares após tratamento crônico com carbamazepina ou lamotrigina em ratos com epilepsia induzida pelo modelo da pilocarpina.

2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar se o uso crônico de carbamazepina ou lamotrigina altera a resposta cardiovascular basal (pressão arterial média, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, frequência cardíaca e traçado eletrocardiográfico) em ratos com epilepsia;
- Avaliar se o uso crônico de carbamazepina ou lamotrigina altera a resposta cardiovascular após estímulo β -adrenérgico em ratos com epilepsia;
- Avaliar se o uso crônico de carbamazepina ou lamotrigina torna o coração mais susceptível a arritmias em ratos com epilepsia;
- Avaliar se o uso crônico de carbamazepina ou lamotrigina altera a variabilidade da frequência cardíaca e a participação do sistema nervoso autônomo na regulação cardiovascular em ratos com epilepsia;
- Avaliar se o uso crônico de carbamazepina ou lamotrigina altera a resposta barorreflexa em ratos com epilepsia.

3- METODOLOGIA

3.1 – Animais

Todos os protocolos experimentais empregados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG) (CEUA 024/2012). Foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar com peso inicial de 240 a 280 gramas, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFG. Os animais foram alocados no Biotério de Manutenção de Animais do Departamento de Ciências Fisiológicas/ICB/UFG em grupos de no máximo cinco ratos por gaiola antes do tratamento e mantidos individualmente em gaiolas transparentes após a indução da epilepsia, afim de permitir o monitoramento das crises epilépticas. Com acesso livre a água e ração, os animais foram mantidos em um ambiente controlado com ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acessas às 7:00 horas) e temperatura ambiente de 22 ± 1 °C.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos: controle (n=12); epilepsia (n=8); epiléptico tratado com CBZ (n=8) e epiléptico tratado com LTG (n=8). Para a formação dos grupos com epilepsia, os animais foram submetidos a indução da epilepsia pelo modelo da PILO. Os ratos do grupo controle tinham, no momento da coleta de dados, a mesma idade média dos ratos com epilepsia, além de serem mantidos no mesmo ambiente que os animais do grupo epilepsia durante todo período de experimentação.

Ao fim dos protocolos *in vivo*, os animais foram eutanasiados por decapitação com o auxílio de uma guilhotina para seguimento dos protocolo *ex vivo*.

3.2 – Protocolo Experimental para Indução de Epilepsia

Para obtenção de ratos com epilepsia utilizamos o modelo da PILO. Utilizou-se a dose de 350 mg/kg de Pilocarpina para todos os animais. Esta

droga foi injetada por via intraperitoneal e os seus efeitos foram observados e classificados segundo a metodologia descrita por Turski et al (1983).

Todos os animais foram pré-tratados subcutaneamente com Metil-escopolamina (1mg/kg), 30 minutos antes de injeção da PILO. A administração da metil-escopolamina tem por finalidade evitar os efeitos periféricos provocados pela PILO. O SE foi bloqueado depois de três horas através da administração de Diazepam (8mg/kg), intraperitonealmente. Para hidratar os animais, foi injetado 1 ml de salina por via subcutânea.

3.3 - Monitoramento de Crises

Todos os animais pertencentes aos grupos com epilepsia foram levados para uma sala de monitoramento por vídeo imediatamente após o bloqueio do estado de mal epilético. Esses animais foram filmados 24 horas por dia através de uma Câmera Infravermelha conectada a um Gravador de Vídeo Digital. Posteriormente, as gravações foram analisadas e, após o aparecimento da primeira crise epilética espontânea (início do período crônico) iniciou-se o protocolo de tratamento de acordo com cada grupo específico, durante 60 dias. Durante esse período o monitoramento foi continuado para quantificação das crises de cada animal. É importante ressaltar que o tipo de crise identificada pelo monitoramento por vídeo inclui somente as crises tônico-clônico generalizadas, que pertencem ao estágio 5 da escala de Racine utilizada para caracterizar a intensidade das crises epiléticas (159). Após esse período foram realizados os demais protocolos experimentais.

3.4 - Tratamento com DAEs

Para o tratamento dos animais com epilepsia foram usadas duas drogas antiepiléticas distintas: a carbamazepina (Tegretard®) ou a lamotrigina (Lamitor®). Ambas foram administradas uma vez ao dia por via oral por gavagem (150mg/kg), diluídas em água (1mL). No grupo epilético sem tratamento foi administrada 1 mL de água (v.o.) para que animais recebessem o mesmo manuseio e estímulo dos animais do grupos tratados com DAEs. A

administração da DAE foi iniciada após a constatação da primeira crise espontânea do animal, e prosseguiu-se com o tratamento diário por 60 dias.

3.5 - Procedimentos Cirúrgicos

Em todos os animais foi administrado no pré-operatório, antibiótico (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte – Fort Dodge Saúde Animal Ltda., SP, Brasil) na dose de 100 mg/kg e no pré-operatório e recuperação dos animais foi administrado anti-inflamatório (Flunixin Injetável – Chemitec, SP, Brasil) na dose de 2 mg/kg por via intramuscular.

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (Sigma-Aldrich, MO, EUA) na dose de 250 mg/kg por via intraperitoneal e após a verificação de ausência de resposta de retirada da pata traseira à estimulação nociceptiva, uma incisão ventral da pata traseira esquerda foi realizada para exposição e dissecação do feixe vaso nervoso femoral para o implante de duas cânulas de polietileno. Logo em seguida um tubo de polietileno PE-10 de 3 cm para a veia e 4 cm para a artéria, foi introduzido em cada vaso. Esse tubo foi previamente soldado a outro tubo de polietileno PE-50 de 16 cm de comprimento e preenchido com solução salina estéril (NaCl 0,9%) heparinizada. As porções PE-50 foram transpassadas subcutaneamente por meio de um guia, suas extremidades foram exteriorizadas através uma incisão realizada na região dorsal do pescoço e obstruídas com um pino de metal. As cânulas foram introduzidas na veia cava inferior através da veia femoral para infusão de drogas, e na aorta abdominal através da artéria femoral para obtenção do registro de pressão arterial pulsátil.

Para a implantação de eletrodos para registro do eletrocardiograma (ECG) uma incisão ventral logo abaixo do esterno foi realizada para exposição do processo xifóide, e outra incisão ventral na região do pescoço foi realizada para exposição do músculo esternocleidomastóideo. Foram utilizados eletrodos compostos por dois cabos de 0,14 mm de espessura (um de 4 cm e outro de 6 cm de comprimento) ligados por uma das extremidades a um conector RJ11 6x4 macho. A extremidade livre do cabo foi desencapada para a captação do sinal elétrico do coração. Os cabos do eletrodo foram transpassados subcutaneamente por meio de um guia no sentido da incisão realizada na

região dorsal do pescoço para as incisões realizadas na região ventral. A porção desencapada do cabo de 6 cm foi fixada na superfície dorsal do processo xifóide, enquanto que a porção desencapada do cabo de 4 cm foi inserida cuidadosamente no mediastino anterior e suturada sob o músculo esternocleidomastóideo. A implantação intratorácica é importante para que se evitem os ruídos advindos da contração muscular.

Finalizando os procedimentos cirúrgicos as extremidades das cânulas e do eletrodo foram fixadas na superfície dorsal do animal e todas as incisões foram suturadas. Os animais foram então alocados em suas gaiolas para recuperação por pelo menos 24 horas antes do protocolo de registro. Somente os animais que mantiveram um bom estado de saúde após os procedimentos cirúrgicos foram utilizados.

3.6 - Protocolo de Registro de Parâmetros Cardiovasculares em Animal Acordado

Para registro da pressão arterial pulsátil (PAP) a cânula inserida na artéria femoral foi acoplada a um transdutor de pressão DTX (Viggo Spectramed, CA, EUA) ligado a um amplificador de sinal que, por sua vez, estava conectado ao sistema de aquisição de dados MP150 (BIOPAC System Inc., CA, EUA) e ao software AcqKnowledge v.4.2 (BIOPAC System Inc., CA, EUA). Os registros foram realizados em uma frequência de amostragem de 1000 Hz a fim de obter-se pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD). A PAP foi registrada após calibração prévia do sistema. A pressão arterial média (PAM) foi calculada a partir dos valores de PAP.

Para registro do ECG, um cabo contendo um conector RJ11 6x4 fêmea foi ligado ao conector do eletrodo, foram conectados por um sistema de fios (permitindo total mobilidade ao animal) a uma conexão que manteve o contato eletrônico independente da movimentação do animal e todo o conjunto permaneceu conectado a um amplificador de sinais (AECAD 02P; AVS Projetos). Através do software de leitura da placa, Chart 5 for Windows (Power Lab System), o sinal eletrocardiográfico foi coletado continuamente durante o

registro acordado com uma frequência de amostragem de 1000 Hz e um filtro passa banda de 0.5 Hz a 100 Hz.

O software utilizado possui um algoritmo predeterminado para detecção dos picos R do eletrocardiograma, o qual pode ser ajustado de acordo com o tipo (humano, coelho e ratos) e também com a qualidade do sinal.

3.6.1- Teste de Barorreflexo

Após conexão de eletrodos e cânula foi iniciado o registro acordado, que consistiu em 60 minutos de estabilização sendo o último minuto extraído para os parâmetros cardiovasculares basais. Posteriormente, os animais foram expostos a um teste que visa verificar a sensibilidade do reflexo barorreceptor diante ao tratamento com DAEs, esse teste foi realizado com duas administrações em bolus do vasopressor fenilefrina (PHE- 5µg/kg) (i.v.) seguida de administração de solução salina estéril (NaCl 0,9%) (i.v.) em intervalos de 5 minutos. Verificou-se as respostas causadas pelo estímulo da segunda dose de PHE. Após nova estabilização da PAP, administrou-se o hipotensor nitroprussiato de sódio (NPS - 10µg/kg) (i.v.), em protocolo equivalente ao de PHE descrito acima.

A PAP, PAM, ECG e FC foram analisadas durante todo o procedimento de registro acordado, em que os picos máximos e mínimos da PAM e FC foram extraídos para análise da resposta barorreflexa. Um esquema dos parâmetros coletados para análise pode ser visto na Figura 3.

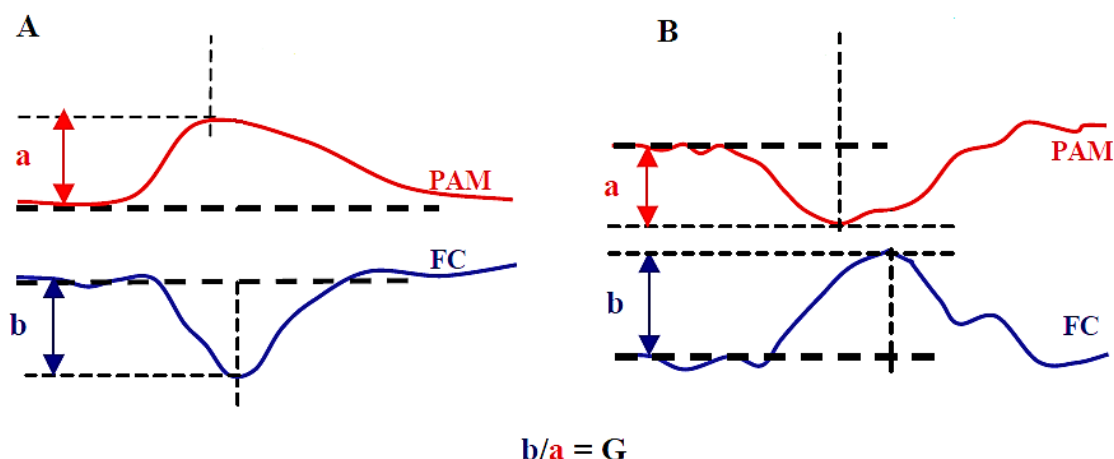


Figura 3 – Representação dos parâmetros avaliados em cada estimulação barorreflexa por aumentos (A) ou quedas (B) da pressão arterial média (PAM) em todos os grupos experimentais. (a) Perturbação máxima promovidas na PAM. (b) Máxima alteração barorreflexa na frequência cardíaca (FC). (G) Ganho barorreflexo.

Os parâmetros cardiovasculares: PAS, PAD, pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e eletrocardiograma (ECG) foram analisados com o auxílio dos programas LabChart Reader.

3.6.2- Desafio com Isoproterenol

Um dia após o teste de sensibilidade barorreflexa, os animais foram submetidos ao desafio com isoproterenol (0,1mL/100g), visando a análise da sensibilidade β -adrenérgica em animais epilépticos e sem epilepsia.

Após 20 minutos de estabilização dos parâmetros cardiovasculares os animais foram expostos a um estímulo β -adrenérgico com bolus de 1 μ g de isoproterenol. A FC máxima atingida foi extraída para análise do estímulo. A quantificação de possíveis extrassístoles também foi verificada neste protocolo durante período basal e após estímulo β -adrenérgico.

Ao fim do protocolo, os eletrodos e cânula foram desconectados e o animal eutanasiado por decapitação com o auxílio de uma guilhotina. Um esquema dos protocolos experimentais de ambos dias de registro está ilustrado na Figura 4.

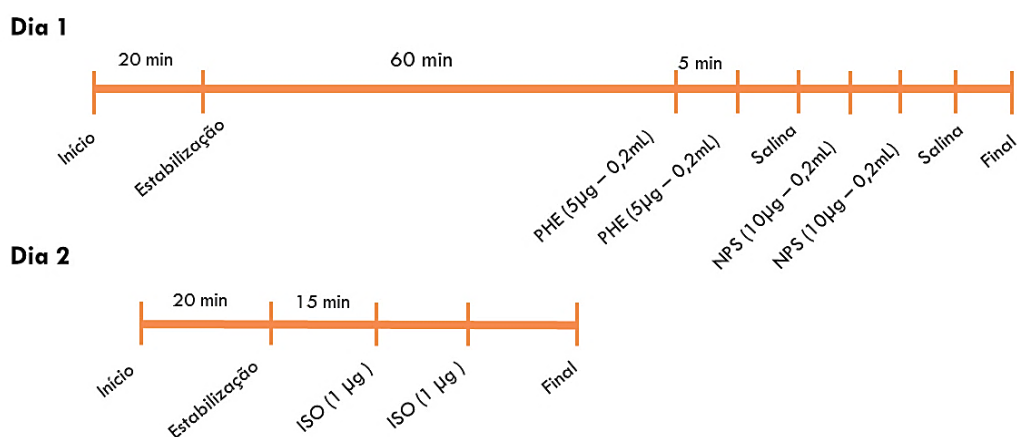


Figura 4 – Representação esquemática dos protocolos realizados durante os registros. Registro da sensibilidade barorreflexa (Dia 1). Registro do desafio com isoproterenol (Dia 2). PHE: fenilefrina; NPS: nitroprussiato de sódio; ISO: isoproterenol; Min: minutos.

3.7 - Análise do Traçado Eletrocardiográfico

Para a quantificação das arritmias cardíacas, o traçado eletrocardiográfico foi analisado nos períodos do registro (basal e após administração de ISO). O tipo de arritmia verificada foi a extra-sístole ventricular e a quantificação foi realizada através da razão entre número de extra-sístoles a cada 1000 batimentos cardíacos.

3.8 - Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca

Para a análise da VFC somente segmentos do registro de ECG sem artefatos foram utilizados. As ondas R do traçado eletrocardiográfico foram identificadas a cada batimento cardíaco e uma série de intervalos RR sucessivos (iRR) foram gerados para cada animal.

Na análise linear, um total de 5 séries estacionárias de iRR contendo 500 ± 100 batimentos foram geradas para cada animal. Após a realização das análises a média das 5 séries foi calculada. Nas análises no domínio do tempo calculou-se o desvio padrão de todos os iRR normais (SDNN) e a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre iRR normais adjacentes (RMSSD).

Para a análise no domínio da frequência dois componentes oscilatórios majoritários foram observados a partir do espectro: os componentes de baixa frequência – Low Frequency (LF; 0,20 - 0,75 Hz) e de alta frequência – High Frequency (HF; 0,75 - 3,00 Hz). As potências máximas dessas bandas foram comparadas entre os grupos e os resultados foram apresentados nas formas absoluta e normalizada. Além disso relação LF/HF, que caracteriza o balanço simpato-vagal sobre o coração, também foi calculada. Para a análise espectral utilizou-se o algoritmo transformada rápida de Fourier que permite a obtenção do espectro de potência em função da frequência, a partir dos padrões complexos de oscilações destas variáveis. As séries temporais foram divididas em segmentos contínuos de 128 pontos e sobrepostos a 50%.

Para a realização da análise simbólica, a série de iRR previamente selecionada é distribuída em 6 níveis (0 a 5) e transformada em uma sequência de símbolos, a partir dos quais são construídos os padrões (sequências de 3 símbolos). Tais padrões são agrupados em 4 famílias, considerando a quantidade e o tipo de variações existentes entre os símbolos subsequentes: 0V - padrão sem variação; 1V - padrão com uma variação; 2LV - padrão com 2 variações iguais; 2ULV - padrão com 2 variações diferentes. As frequências de ocorrência dessas famílias (0V%, 1V%, 2LV% e 2ULV%) são avaliadas, sendo que estudos mostram que o índice simbólico 0V% é relacionado à modulação simpática cardíaca, enquanto o índice 1V% representa a presença simultânea das modulações vagal e simpática, e os índices 2LV% e 2ULV% correspondem à modulação vagal. Para realização da análise simbólica em nosso estudo, segmentos estáveis contendo 1000 ± 100 batimentos foram escolhidos e processados para cada animal.

Devido a presença de artefatos bem como a ação modulatória dos fármacos utilizados nos tetes após a administração de PHE, NPS e ISO, só foi possível a realização da análise da VFC no período basal do registro. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa CardioSeries v2.4 (USP, SP, Brasil).

3.9- Índices de Massa

Após o término dos procedimentos *in vivo* os animais foram eutanasiados através de decapitação com uso de guilhotina e logo em seguida os seguintes tecidos foram coletados e pesados: ventrículo esquerdo (VE), hipocampo (hpc), amígdala (amg), hipotálamo (hpt) e córtex (ctx). Além disso, a tíbia dos animais foi retirada e seu comprimento medido para a quantificação dos índices de massa das estruturas coletadas através da razão do peso da estrutura (mg), pelo comprimento da tíbia (cm), representada pela seguinte equação:

$$IM = \frac{PE \text{ (mg)}}{CT \text{ (cm)}}$$

O peso do VE foi normalizado pelo comprimento da tíbia para avaliar a hipertrofia cardíaca. O peso das demais estruturas também foi normalizado pelo comprimento da tíbia para avaliar massa das estruturas retirando a influência da diferença de tamanho desses animais.

3.10- Análise Histológica

Para a análise morfométrica, os corações excisados foram perfundidos com uma solução de KCl 4 mM para o relaxamento total das fibras cardíacas. Da parte central do ventrículo esquerdo foi cortado um anel de cerca de 5 mm de espessura compreendendo toda a extensão de sua parede. O material foi fixado em metacarn durante 4h. Após esse período, o tecido foi desidratado em uma série de etanóis em concentrações crescentes, diafanizado em xilol e incluído em paraplast (Sigma-Aldrich, MO, EUA) (Quadro 1). Cortes transversais seriados de 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo (Leica RM2155, BW, Germany) e fixado em lâminas (Exacta, 26x76x1x1.2mm). Após a secção o material foi reidratado, submetido a coloração por Picrosirius (Quadro 2) e analisado em microscopia óptica.

Quadro 1 - Protocolo de desidratação, diafanização e inclusão tecidual em paraplast.

Desidratação			
Reagente	Tempo	Procedimento	Temperatura
Etanol 80%	Over Night	Imersão	Ambiente
Etanol 95 %	60 min	Imersão	Ambiente
Etanol 100 % I	60 min	Imersão	Ambiente
Etanol 100 % II	60 min	Imersão	Ambiente
Etanol 100 % III	60 min	Imersão	Ambiente
Diafanização			
Reagente	Tempo	Procedimento	Temperatura
Xilol I	60 min	Imersão	Ambiente
Xilol II	60 min	Imersão	Ambiente
Infiltração			
Reagente	Tempo	Procedimento	Temperatura
Paraplast I	60 min	Imersão	58° - 60°C
Paraplast II	60 min	Imersão	58° - 60°C
Inclusão			
Reagente	Tempo	Procedimento	Temperatura
Paraplast de inclusão	Indeterminado	Embocamento	58° - 60°C

Quadro 2 - Protocolo de coloração – Picrosirius

Reagente	Tempo (min)	Procedimento
Xilol I	20	Imersão
Xilol II	20	Imersão
Etanol 100 % I	1	Imersão
Etanol 100 % II	2	Imersão
Etanol 70%	1	Imersão
Etanol 50%	1	Imersão
Água Corrente	2	Imersão
Picrosirius	60	Imersão
Água Corrente	0,3	Imersão Rápida
Hematoxilina	8	Imersão
Água Corrente	10	Imersão
Etanol 95 %	0,3	Imersão Rápida
Etanol 95 %	1	Imersão
Etanol 100 % I	1	Imersão
Etanol 100 % II	1	Imersão
Etanol 100 % III	1	Imersão
Xilol I	1	Imersão
Xilol II	1	Imersão
Xilol III	1	Imersão
Montagem das Lâminas		

Os cortes foram examinados e capturados no microscópio Zeiss Scope A1 com câmera digital acoplada (AxioCam HRc-Zeiss), digitalizados no software Zen Lite 2012, e posteriormente analisados no programa de análise de imagem computadorizado Image-Pro-Plus v6.0.0.260 (Media Cybernetics Inc., MD, EUA).

A mensuração do diâmetro dos cardiomiócitos foi realizada em campos com aumento de 400x e apenas naqueles com secção longitudinal, e que apresentavam limites celulares e núcleo visíveis. Um total de 190 cardiomiócitos foram medidos em cada grupo obtendo assim a medida da área de secção transversa (AST).

Para análise de colágeno perivascular, 15 vasos foram selecionados aleatoriamente em aumento com lente objetiva de 40x. Apenas o colágeno imediatamente ao redor de cada vaso foi considerado para representar a deposição de colágeno perivascular. A quantidade de colágeno perivascular foi

expressa como a razão entre a área de colágeno ao redor do vaso traçado e a área total da secção transversal, a fim de corrigir as diferenças no tamanho do vaso. Além disso, também foi mensurado o colágeno total presente no interstício do ventrículo esquerdo. Para isto foram analisados um total de 45 campos por grupo, dos quais todos eram afastados de regiões perivasculares.

3.11- Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prism v.5.0 (Graph-Pad Software Inc., CA, EUA). As diferenças entre as médias foram determinadas utilizando-se a Análise de Variância de uma via (One-Way ANOVA) seguida de pós-teste de Dunnett. Análise de Variância de duas vias (Two-Way ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni, foi utilizada para análise da FC máxima. A significância estatística foi determinada para $p < 0,05$. Os dados são apresentados como média \pm EPM.

4-RESULTADOS

4.1 - Frequência de Crises

As crises epilépticas verificadas através de vídeo-monitoramento durante o período de sessenta dias de epilepsia dos animais, não revelaram diferenças significativas entre os grupos tratados e não tratados como demonstrado na Figura 5.

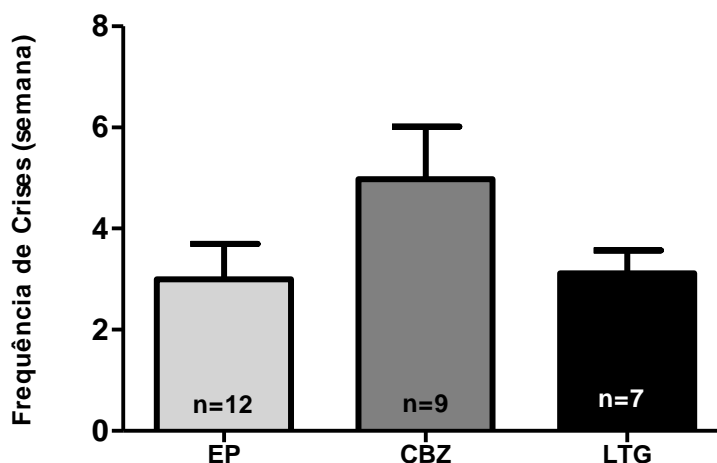


Figura 5 – Quantificação de frequência de crises epilépticas (média por semana). EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). Média \pm EPM. ANOVA de uma via.

4.2 - Parâmetros Cardiovasculares Basais

Nas análises dos registros de animais acordados foram verificados os valores de PAS, PAD, PAM obtidos através de canulação da artéria femoral e valores da FC e arritmias obtidos através do implante de eletrodos para ECG.

Como observado na figura 6A, a PAS dos animais com epilepsia foi maior em comparação ao controle. O tratamento com CBZ foi capaz de reverter esse aumento, já no tratamento com LTG não houve redução significativa da PAS (Figura 6A). Além do aumento na PAS, o grupo EP também apresentou

uma elevada PAD em comparação ao grupo CNT, no entanto o tratamento com CBZ ou LTG não reduziu significativamente este aumento. (Figura 6B).

Os dados de PAS refletem os resultados obtidos ao analisar a PAM, onde o grupo EP demonstrou uma elevada PAM em comparação ao grupo CNT e o tratamento com CBZ reverteu o aumento da PAM, esta redução não foi observada no grupo LTG (Figura 6C).

Ao analisar a FC basal, observamos que a CBZ e LTG foram capazes de reduzir significativamente a FC em animais EP, que apresentou elevada FC quando comparado ao grupo CNT (Figura 6D). Na quantificação do número de extrassistoles, não foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 6E). Um traçado eletrocardiográfico normal e um exemplo de extrassístole estão ilustrados na Figura 7A e 7B respectivamente.

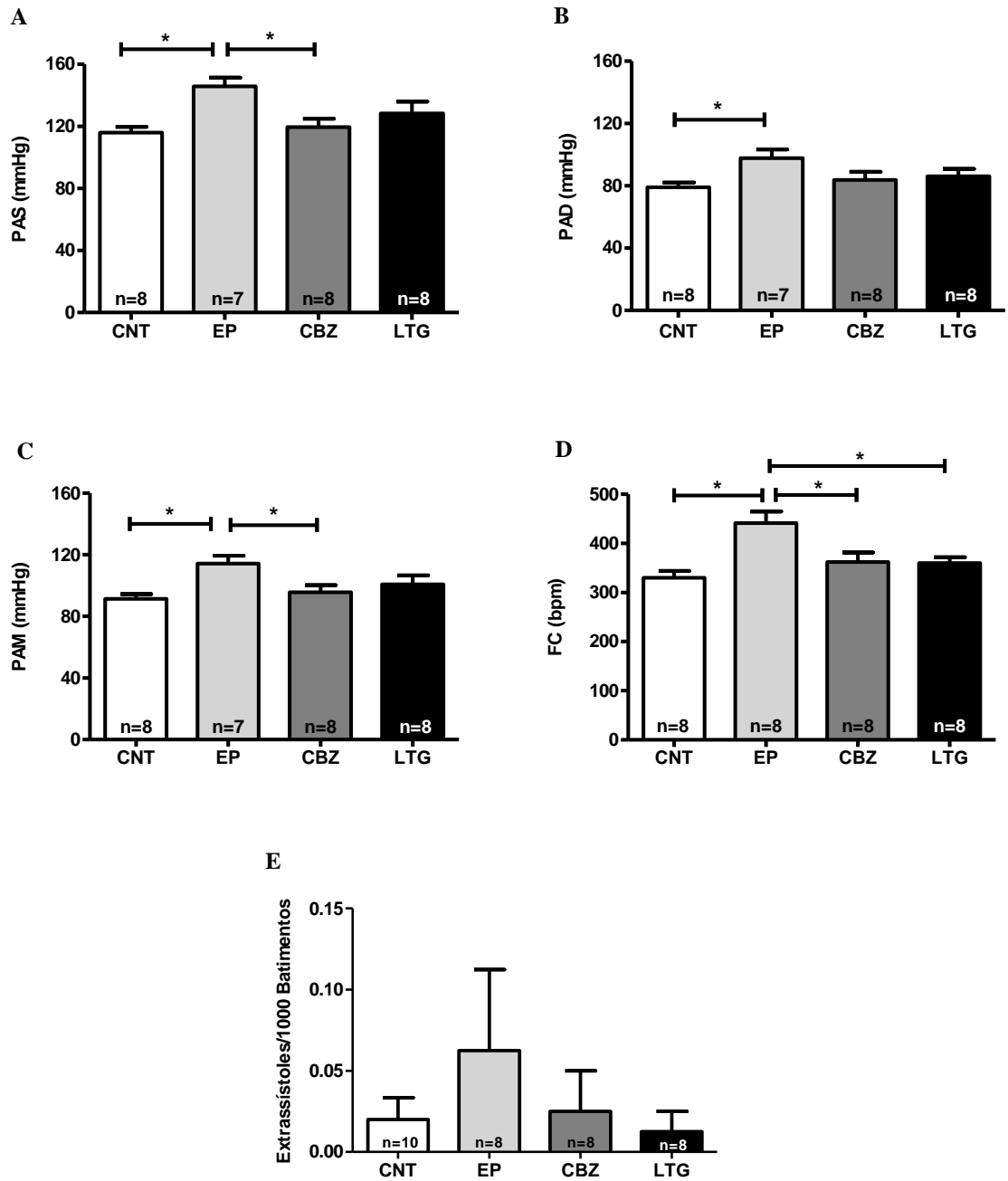


Figura 6 – Parâmetros cardiovasculares basais dos animais em registro acordado. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). A: PAS (pressão arterial sistólica); B: PAD (pressão arterial diastólica); C: PAM (pressão arterial média); D: FC (frequência cardíaca); E: Número de Arritmias (extra-sístoles). Média \pm EPM. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$.



Figura 7 – Traçados eletrocardiográficos representativos de rato Wistar com epilepsia. A: batimentos cardíacos normais. B: batimento ectópico - extrasístole (seta).

4.3 - Teste de Barorreflexo

Com a avaliação da sensibilidade barorreflexa através da administração de PHE e NPS, não obtivemos resultados significativamente diferentes (Figura 8A e 8B).

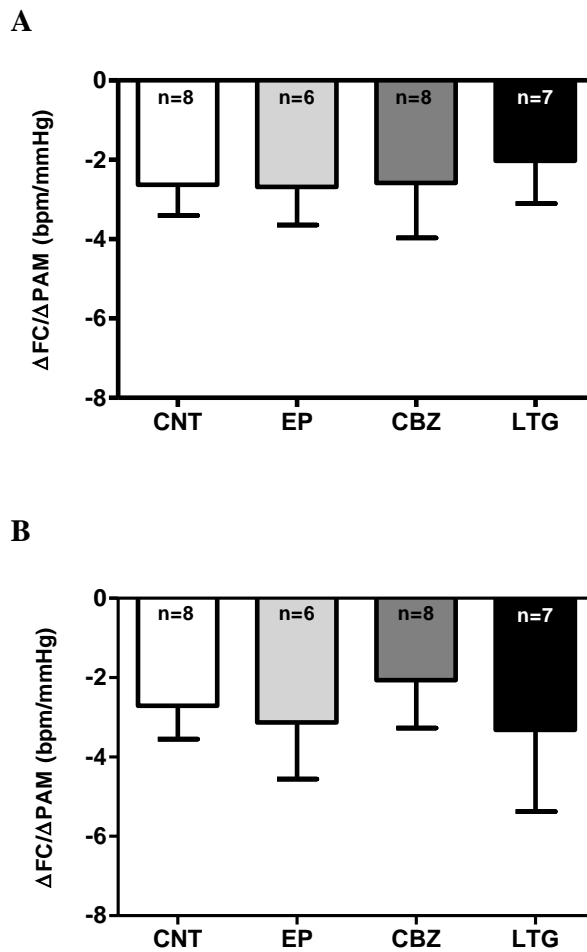


Figura 8 – Resposta da sensibilidade barorreflexa após administração em *bolus* de 5 μg de PHE e 10 μg de NPS. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). A: Índice médio de bradicardia; B: Índice médio de taquicardia. Média \pm EPM. ANOVA de um via.

4.4 - Desafio com Isoproterenol

A realização de estímulo β -adrenérgico com ISO não alterou a FC máxima entre os grupos. No entanto todos os grupos apresentaram aumento significativo da FC máxima quando comparado com o basal (Figura 9A). A porcentagem de aumento da FC máxima não demonstrou diferenças significativas entre os grupos estudados como demonstrado na Figura 9B.

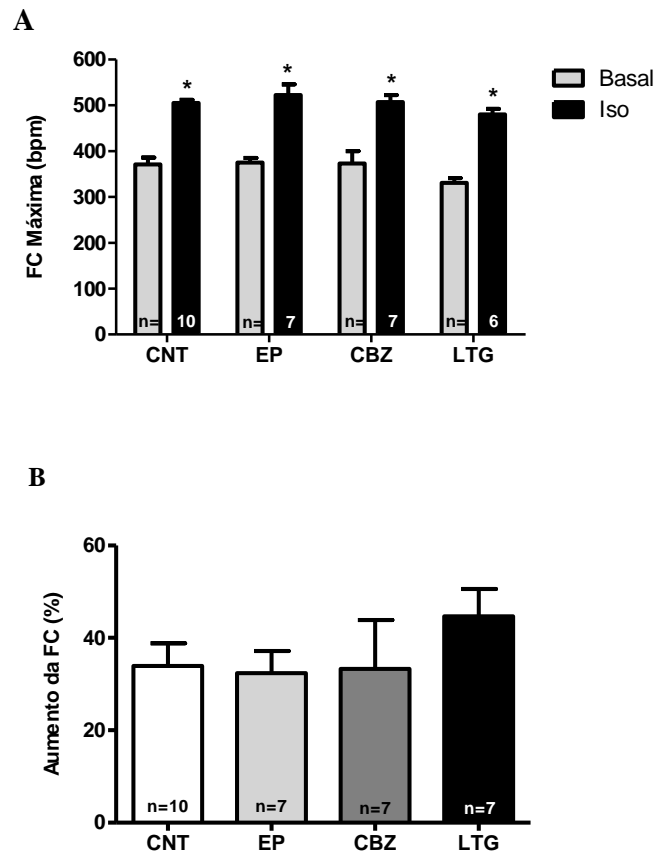


Figura 9 - Resposta na frequência cardíaca após administração de ISO 1 µg/kg. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). A: resposta máxima da FC comparada ao período basal; B: variação do aumento da FC (valores em porcentagem). Média ± EPM. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni (A); ANOVA de uma via (B).

4.5 - Variabilidade da Frequência Cardíaca

4.5.1 - Análise no Domínio do Tempo

A VFC foi avaliada nos domínios do tempo e de frequência, em trechos de sinais estáveis e com mínimos artefatos. Nestes mesmos trechos também foi realizada uma análise não linear da atividade simpato-vagal da FC.

Ao analisarmos a VFC no domínio do tempo não observamos nenhuma diferença significativa entre os grupos tanto no SDNN (Figura 10A) quanto na RMSSD (Figura 10B).

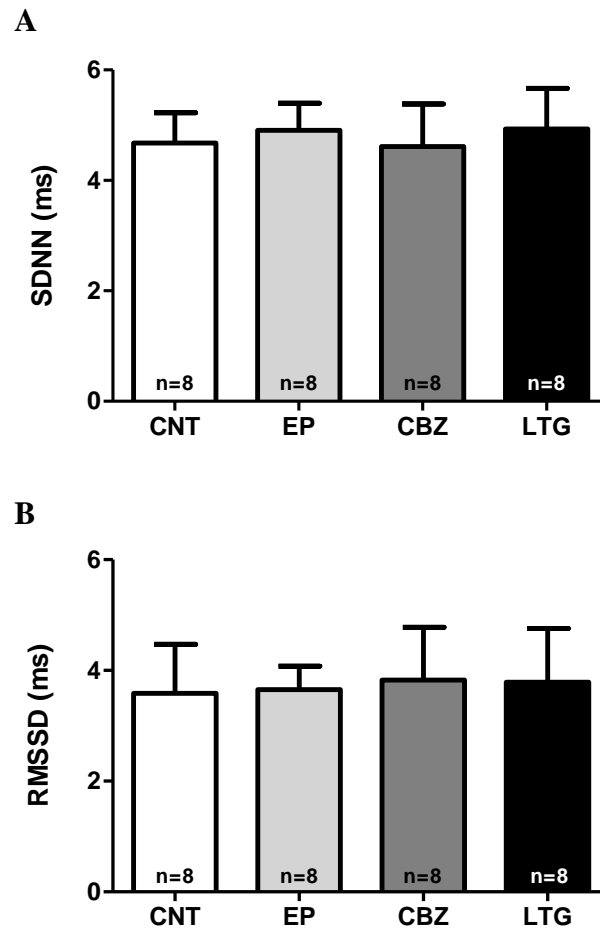


Figura 10 – Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) no domínio do tempo. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). A: SDNN (desvio padrão de todos os iRR normais); B: RMSSD (raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre iRR normais adjacentes). Média \pm EPM. ANOVA de uma via.

4.5.2 - Análise no Domínio da Frequência

Ao avaliarmos a VFC no domínio da frequência os dados de HF (Figuras 11A) e LF (Figuras 11B) normalizados em relação a potência total, não apresentaram diferenças significativas. O balanço simpato-vagal indicado pela razão LF/HF não demonstrou diferenças significativas entre os grupos (Figura 11C).

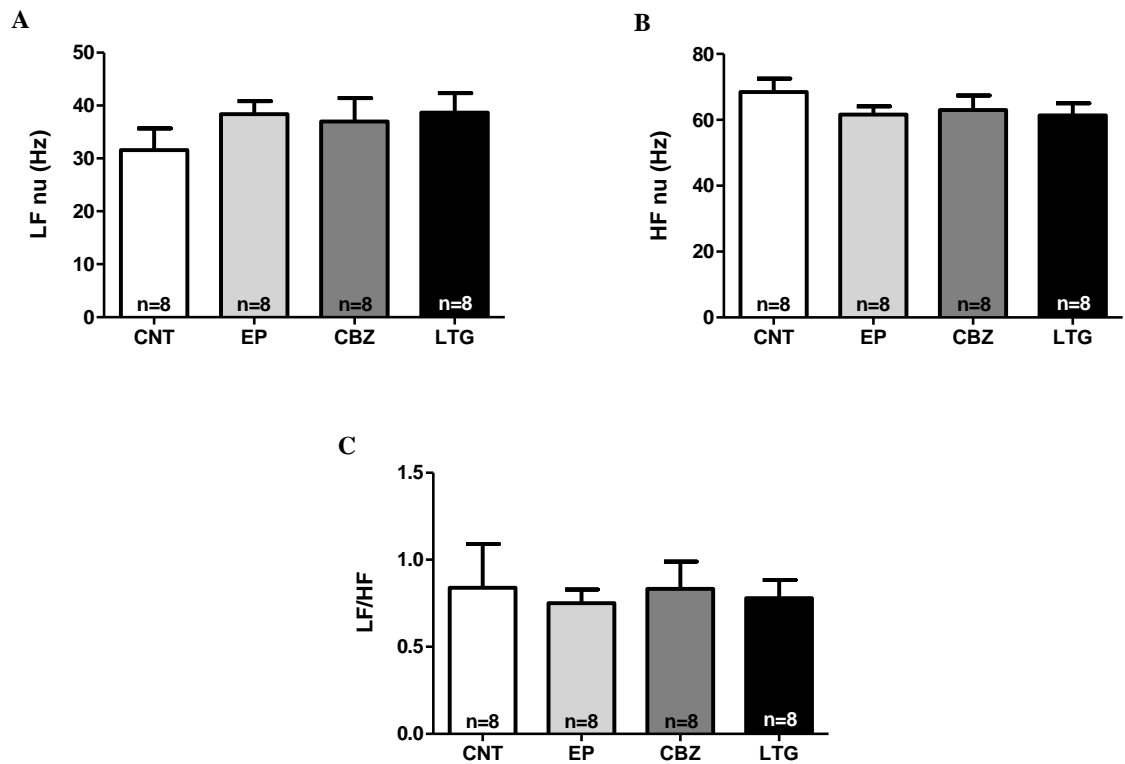


Figura 11 – Análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). LF: Low Frequency – baixa frequência; HF: High Frequency – alta frequência. A: LF normalizado; B: HF normalizado; C: razão de LF e HF. Média \pm EPM. ANOVA de uma via.

4.5.3 - Análise Simbólica

Ao realizar análise não linear da VFC não obtivemos resultados significativamente diferentes entre os grupos conforme mostram as Figuras 12A - 12D.

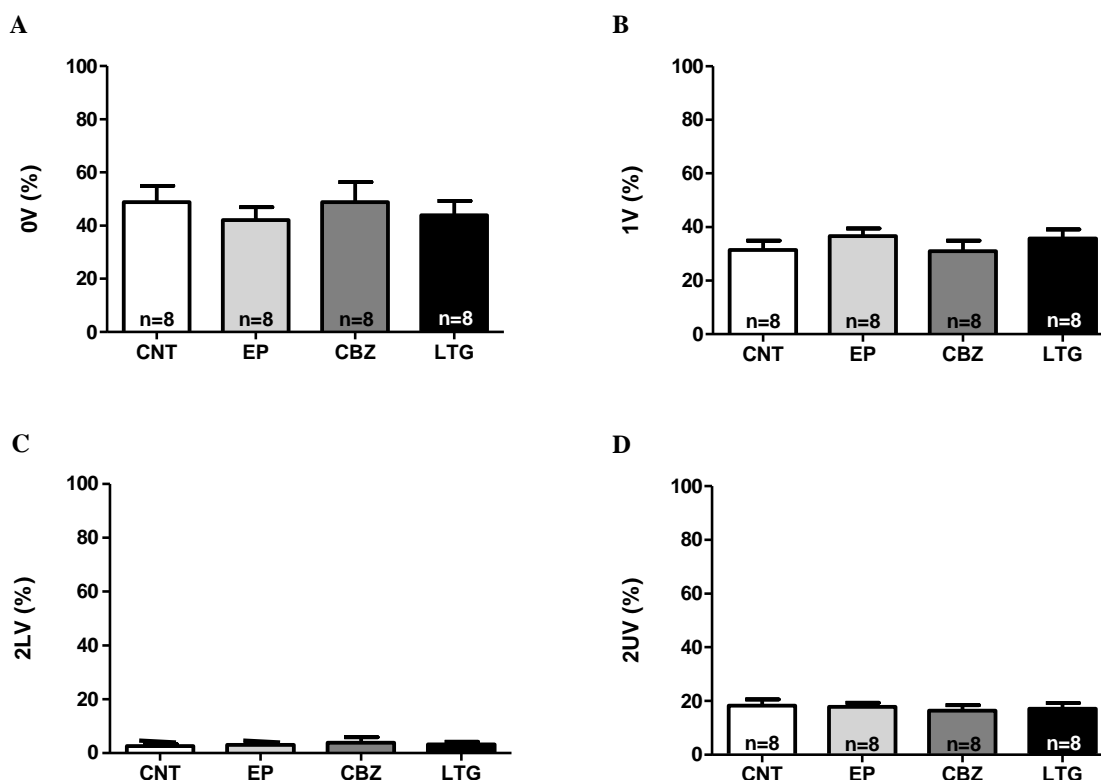


Figura 12 – Avaliação da Modulação Autônômica obtida através da análise simbólica da VFC. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). Valores em porcentagem. 0V: modulação simpática; 1V: presença simultânea das modulações simpática e vagal; 2LV e 2ULV: modulação vagal. Média \pm EPM. ANOVA de uma via.

4.6 - ANÁLISES ESTRUTURAIS E MORFOLÓGICAS

Para avaliação do trofismo da amígdala (Amg), hipocampo (Hpc), hipotálamo (Hpt), córtex (Crtx) e ventrículo esquerdo (VE), foi realizada a razão entre massa da estrutura pelo comprimento da tíbia do animal.

O grupo CBZ apresentou massa hipocampal reduzida em comparação com o CNT, essa redução não foi observada nos demais grupos (Figura 13B). A massa cortical dos grupos EP e CBZ também se mostraram reduzidas quando comparada ao grupo CNT, o mesmo não foi observado no grupo LTG (Figura 13D). Como observado nas figuras 13A e 13C, não houve alterações na massa da amígdala e hipotálamo dos animais epilépticos em comparação aos animais controle.

O tratamento com CBZ reduziu o índice de massa ventricular dos animais epiléticos quando comparados ao grupo controle (Figura 13E).

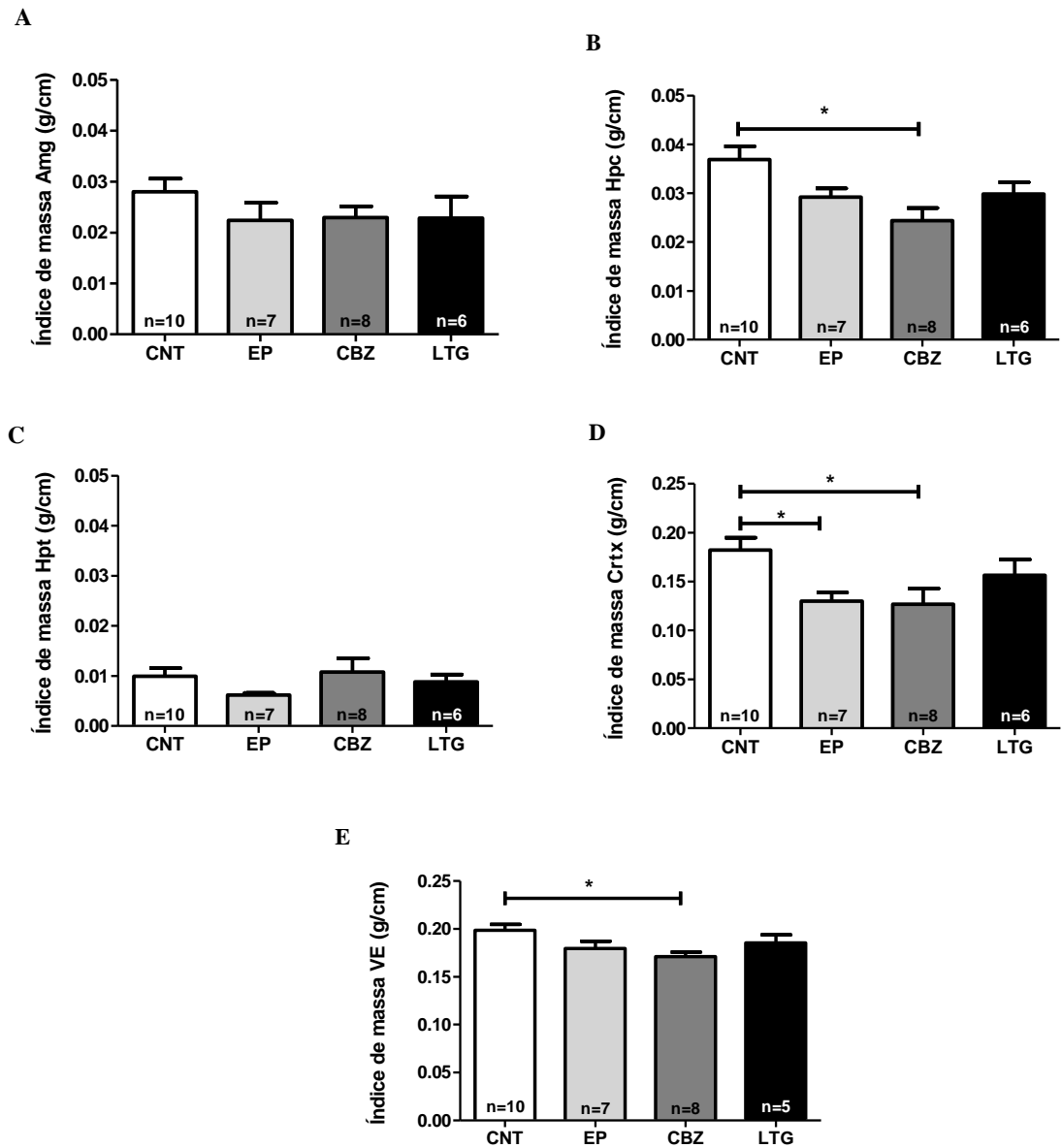
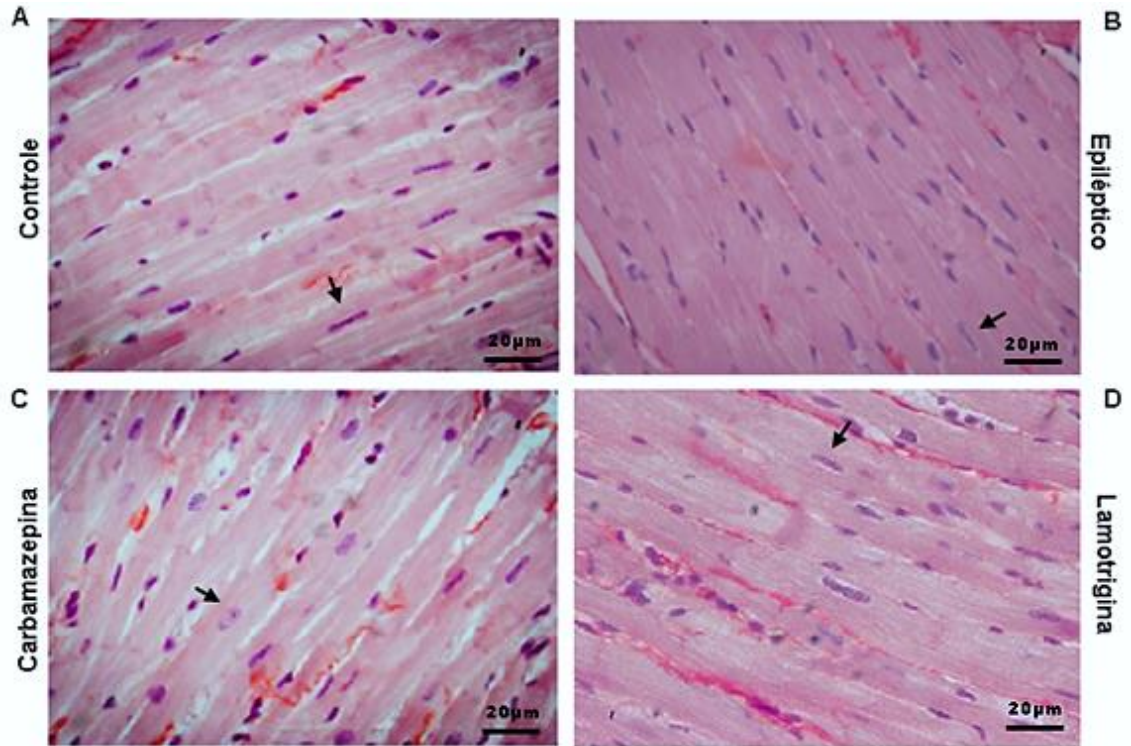


Figura 13 – Índice de massa de estruturas cerebrais e do ventrículo esquerdo (VE). CNT (controle sem epilepsia); EP (epilético tratado com veículo); CBZ (epilético tratado com carbamazepina); LTG (epilético tratado com lamotrigina). A: índice de massa da Amg; B: índice de massa do Hpc; C: V índice de massa do Hpt; D: índice de massa do Crtx; E: índice de massa do VE. O índice de massa foi calculado pela razão: peso da estrutura (mg) / comprimento da tíbia (cm). Média \pm EPM. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, *p < 0,05.

Apesar de não observarmos diferenças no índice de massa ventricular, na análise da média da AST (μm) dos cardiomiócitos, observamos que o grupo EP possui AST aumentada quando comparado aos demais grupos (Figura 14E). Ainda com análise histológica do VE, quantificamos o colágeno perivascular e a porcentagem de colágeno intersticial para avaliação de fibrose miocárdica. Como pode ser visto na Figura 15E, não houve diferença entre os grupos na porcentagem de colágeno intersticial avaliada. No entanto, encontramos um maior acúmulo de colágeno no espaço perivascular do grupo EP em comparação com os grupos CNT e CBZ (Figura 16E). O grupo LTG não apresentou diferença significativa no acúmulo de colágeno perivascular.



E

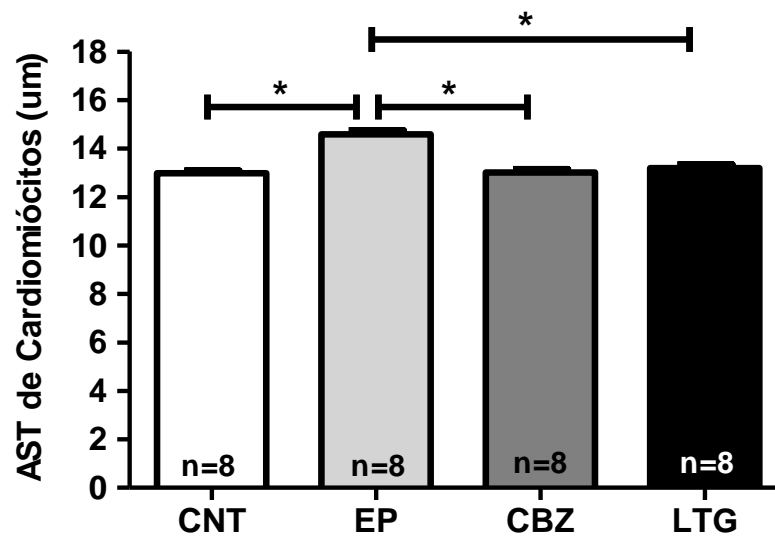
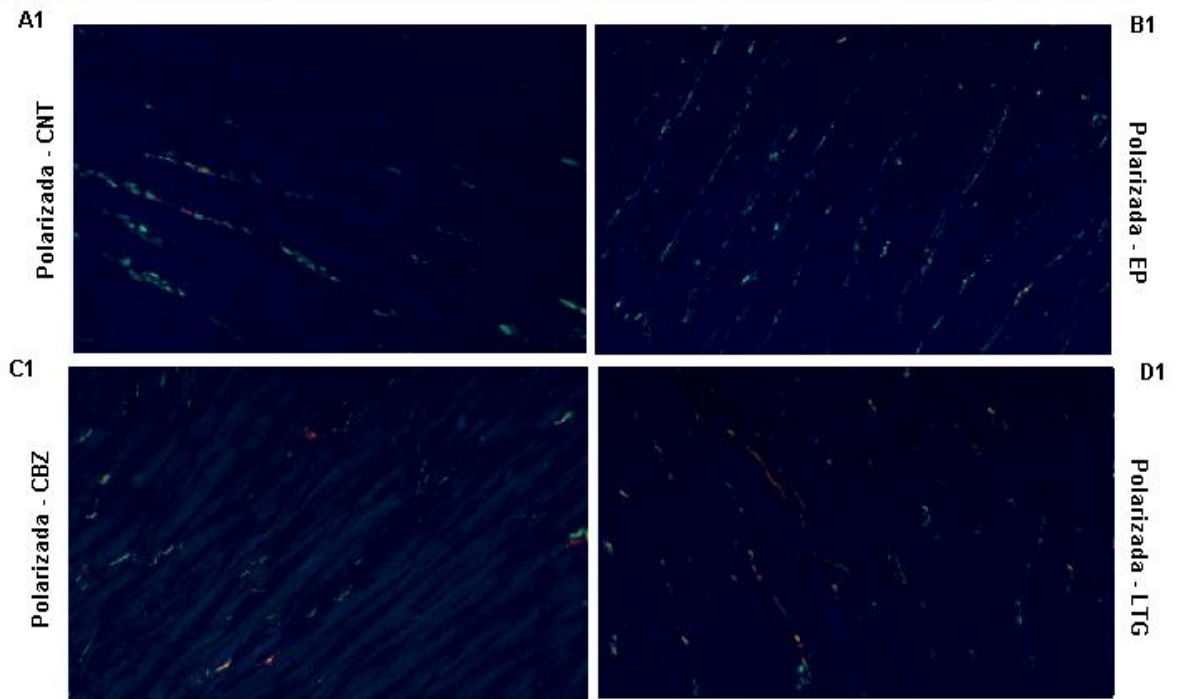
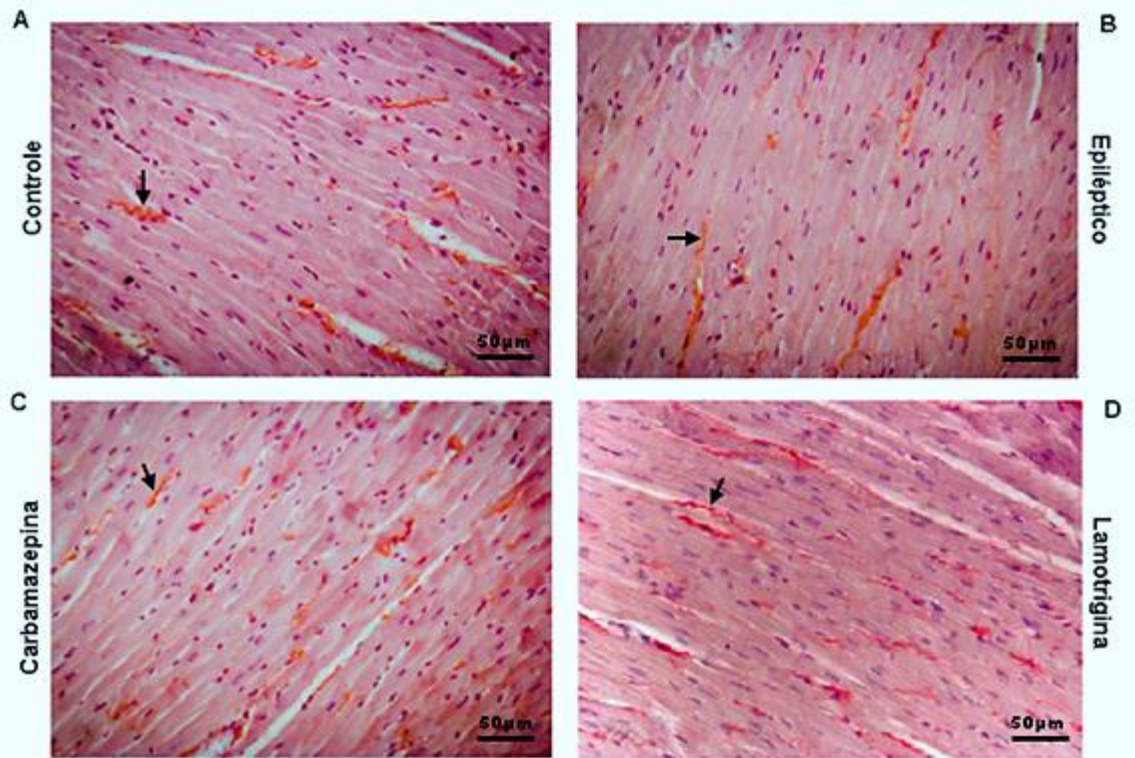


Figura 14 – Morfometria dos cardiomiócitos. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). Fotomicrografia representativa de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em corte transversal dos grupos: CNT (A); EP (B); CBZ (C); LTG (D). Seta: Cardiomiócito; Coloração: Picrosírius; Objetiva: 40x. (E): Área de secção transversa (AST) dos cardiomiócitos. Média \pm EPM. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, * $p < 0,05$.



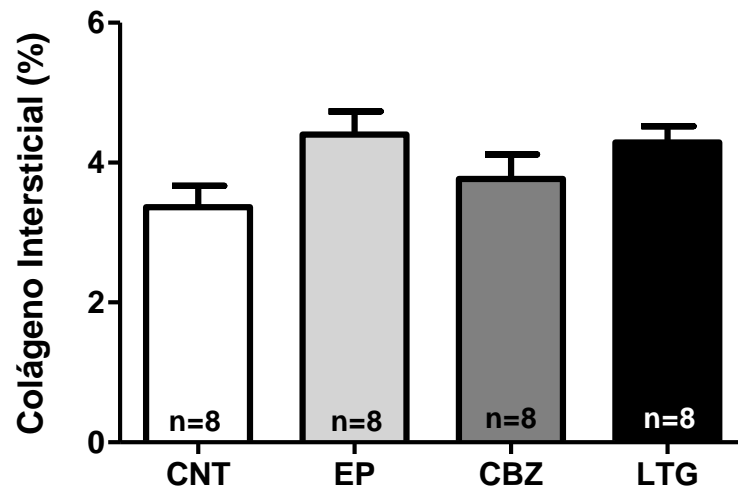
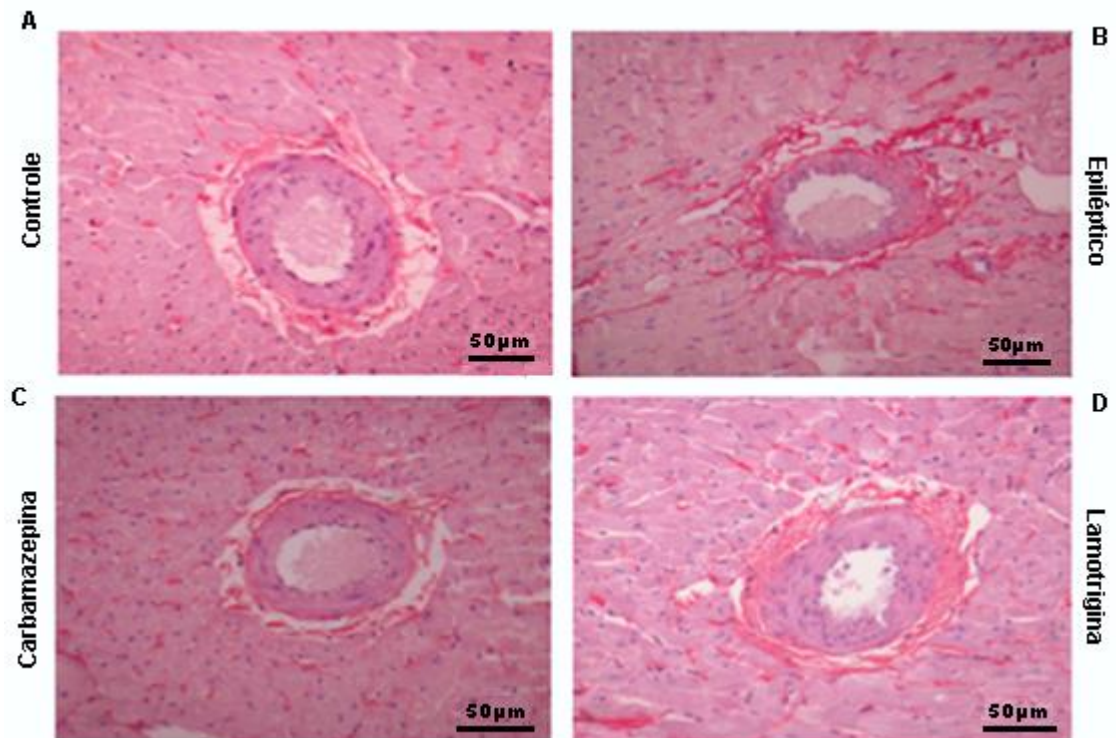
E

Figura 15 – Análise do acúmulo de colágeno intersticial no ventrículo esquerdo. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). Fotomicrografias representativas dos grupos: CNT (A e A1); EP (B e B1); CBZ (C e C1); LTG (D e D1). Coloração: Picrosúrio; Objetiva: 20x. Fotomicrografias A,B,C,D: microscopia de luz comum. Fotomicrografias A1,B1,C1,D1: microscopia de luz polarizada. (E): Porcentagem de colágeno intersticial no ventrículo esquerdo. Média \pm EPM. ANOVA de uma via seguida.



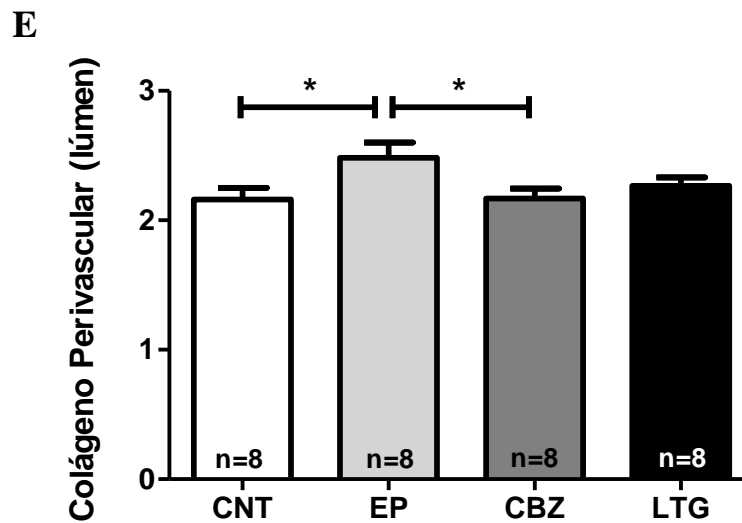
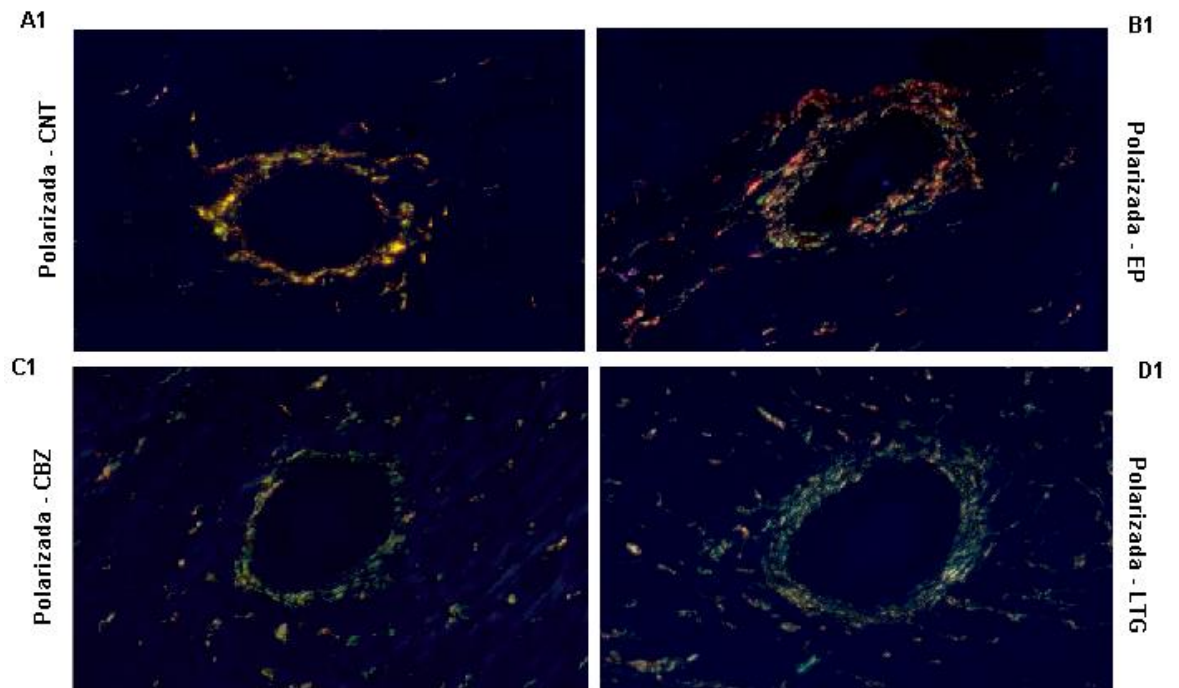


Figura 16 – Análise do acúmulo de colágeno perivascular no ventrículo esquerdo. CNT (controle sem epilepsia); EP (epiléptico tratado com veículo); CBZ (epiléptico tratado com carbamazepina); LTG (epiléptico tratado com lamotrigina). Fotomicrografias representativas dos grupos: CNT (A e A1); EP (B e B1); CBZ (C e C1); LTG (D e D1). Coloração: Picrosírius; Objetiva: 20x. Fotomicrografias A,B,C,D: microscopia de luz comum. Fotomicrografias A1,B1,C1,D1: microscopia de luz polarizada. (E): Porcentagem de colágeno perivascular no ventrículo esquerdo. Média ± EPM. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett, *p < 0,05.

5-DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram: i) ratos epiléticos sem tratamento com DAEs, possuem parâmetros cardiovasculares de repouso (PAS; PAD; PAM; FC) mais elevados, maior AST de cardiomiócitos e acúmulo de colágeno perivascular no VE quando comparados a ratos sem epilepsia; ii) ratos epiléticos tratados com CBZ durante 60 dias apresentam parâmetros cardiovasculares de repouso (PAS; PAM; FC), AST de cardiomiócitos e acúmulo de colágeno perivascular no VE equivalentes aos ratos sem epilepsia; iii) ratos epiléticos tratados com LTG durante 60 dias apresentam FC de repouso e AST de cardiomiócitos no VE menores quando comparadas com as apresentadas por ratos epiléticos sem tratamento.

Em nosso estudo, a presença de FC de repouso aumentada observada em animais epiléticos corroboram com estudos experimentais e clínicos, que demonstram que pacientes com epilepsia apresentam alterações eletrocardiográficas como aumento da FC. Estudos prévios vêm demonstrando que distúrbios de condução e aumento da FC de repouso podem estar frequentemente relacionados à epilepsia. Opherk et al. (2002) analisaram a FC de 102 períodos ictais extraídos do ECG de pacientes com epilepsia, onde observaram o aumento da FC e anormalidades no ECG em pacientes com crises generalizadas em comparação com pacientes com crises parciais.

Resultados semelhantes de FC foram reportados por Nilsen et al (2010), onde 38 pacientes foram avaliados, e pacientes com crises secundariamente generalizadas apresentaram FC pré ictal maior que pacientes com crises parciais complexas, indicando que o envolvimento de regiões autonômicas centrais na atividade ictal pode ocorrer antes das crises. Este envolvimento de regiões autonômicas com as alterações da FC em pacientes com epilepsia também foi mencionado no trabalho de Son et al (2016), após analisarem a duração do aumento da FC em 198 crises. Segundo os autores pacientes com ELT possuem uma duração mais prolongada do aumento da FC que pacientes com ELF. Semelhantemente, em estudo com animais epiléticos observaram que esses animais possuem uma maior FC basal quando comparados com animais sem epilepsia (78), sugerindo que essa alteração ocorre devido a

possíveis modulações autonômicas cardíacas, uma vez que, essa alteração não foi evidenciada na preparação de coração isolado pelo método de Langendorff. (71,160,161)

Ao analisarmos a modulação autonômica através da VFC não observamos alterações significativas entre os grupos. Para avaliar VFC dos animais é necessário um período longo de registro sem artefatos, e como alguns animais epiléticos tiveram crises durante período de recuperação da cirurgia, podendo deslocar eletrodo implantado e também o fato de que os animais se moviam livremente durante todo o registro alguns dados foram retirados da análise pela presença de muitos artefatos que impossibilitaram análise fiel da VFC.

Sabe-se que pacientes com epilepsia podem apresentar manifestações clínicas relacionadas à ativação do SNA durante as crises (81,124). Além disso, a epilepsia pode ser acompanhada por mudanças autonômicas que persistem além dos períodos ictais (85). Uma meta-análise de 39 estudos que avaliaram a VFC em pacientes com epilepsia confirmou a hipótese de desequilíbrio simpato-vagal na epilepsia, caracterizado por valores menores de atividade parassimpática quando comparados aos controles, sugerindo que este desequilíbrio pode influenciar no mecanismo de SUDEP (125). Um aspecto importante em nossos resultados é o fato de a redução da FC após tratamento com DAEs provavelmente não se deve ao efeito das mesmas no sistema de condução cardíaco, pois ambas agem principalmente em canais para sódio e este canal não está envolvido na despolarização do nodo sinoatrial (NSA). Isto indica que, o aumento da FC na epilepsia pode ser devido a alterações do SNA e que o tratamento com DAEs pode melhorar esse desbalanço simpato-vagal.

Indivíduos com epilepsia podem estar predispostos a distúrbios nas funções autonômicas com arritmias subsequentes, devido aos efeitos de crises recorrentes na microestrutura cardíaca (162). Áreas frontais ou áreas temporais geralmente são envolvidas durante uma crise epilética, em que, o impulso ictal se dissemina para o córtex insular ou hipocampo (crises temporais) estendendo-se para o sistema límbico e finalmente, estimulando os núcleos do SNA no bulbo. Um aumento da atividade simpática leva a um aumento na secreção de catecolaminas adrenomedulares, que associado à redução da

atividade parassimpática, pode facilitar a ocorrência de arritmias cardíacas graves. (127,129). Neste contexto, crises epiléticas têm sido associadas com alterações agudas na repolarização cardíaca, incluindo o prolongamento do intervalo QT e o infra-desnivelamento do segmento ST. (130,131,133). Estes resultados não estão apenas limitados aos períodos ictais, mas parecem persistir durante períodos interictais. (76,155). Em nosso estudo, os ratos com epilepsia parecem demonstrar maior número de arritmias em relação aos demais grupos.

Alterações na microestrutura cardíaca, como alterações no sistema de condução e acúmulo de colágeno, também podem constituir um importante substrato para o surgimento de arritmias ventriculares. Estudos correlacionam a presença de taquicardia ventricular não sustentada com a presença de fibrose cardíaca. Dessa forma, tem sido comum, achados que descrevem a presença de fibrose em corações de pacientes com cardiomiopatias e que foram a óbito subitamente (163). Estas alterações podem favorecer o surgimento de arritmias graves, principalmente durante as crises epiléticas, onde há aumento no estímulo nervoso tanto simpático quanto parassimpático. Em nosso estudo não encontramos diferenças no acúmulo de colágeno intersticial entre os grupos, no entanto, observamos maior acúmulo de colágeno perivascular em animais epiléticos quando comparados com animais tratados com CBZ ou com animais sem epilepsia, o que pode estar relacionado com as alterações das respostas cardiovasculares de repouso, também encontradas neste estudo, em animais epiléticos.

Outro componente encontrado em nossos resultados que podem refletir às alterações das respostas cardiovasculares basais é a hipertrofia dos cardiomiócitos em animais epiléticos, em que possivelmente houve influência do aumento da PA nesta resposta. A sobrecarga de pressão é uma condição patofisiológica comum na remodelação cardíaca, em modelos animais, a sobrecarga pressórica induz hipertrofia precoce, fibrose e disfunção diastólica. Nós observamos que o tamanho dos cardiomiócitos não é alterado em animais epiléticos tratados com CBZ ou LTG, este resultado também pode refletir os parâmetros cardiovasculares basais de PA, no entanto, a ação destes fármacos em alguma via de sinalização molecular contribuinte para resposta hipertrófica não pode ser descartada. Em estudo com modelo de hipertrofia

cardíaca induzida por isoproterenol, pesquisadores demonstraram que a administração de CBZ é capaz de reduzir hipertrofia e o aumento da FC causada pelo ISO, os autores sugerem que a ação inibitória da CBZ sobre a adenilato ciclase (AC) influencia na via de sinalização β -adrenérgica. Este estudo também atribui a inibição de AC ao efeito anti-cronotrópico da CBZ, mostrando que CBZ atenua a fosforilação de cyclic amp-response element binding protein (CREB) induzida por ISO (65).

Observamos que parâmetros cardiovasculares basais dos grupos epiléticos tratados com DAEs foram similares aos do grupo controle, sugerindo que o protocolo de tratamento utilizado neste trabalho foi benéfico para os ratos com epilepsia.

Contrariamente, trabalhos mostram que o uso de DAEs é um fator de risco independente para a morte cardíaca súbita, neste contexto, CBZ e LTG já foram discutidos como potenciais fatores de risco para SUDEP em estudos anteriores (91,95,137,138).

Diversos estudos discutem os efeitos da carbamazepina no sistema nervoso autônomo de pacientes com epilepsia. O uso inicial da carbamazepina pode retardar a condução atrioventricular e causar um aumento relativo do tônus simpático que suprime a função parassimpática nos pacientes com epilepsia. Um efeito semelhante é evidente com a retirada abrupta da carbamazepina, que pode levar a uma diminuição da VFC total e a uma predominância da atividade simpática durante o sono. Já a lamotrigina pode inibir o canal de potássio retificador tardio que foi associado a um risco aumentado de morte súbita. Os achados de uma pequena série de casos não controlados sugeriram associação entre lamotrigina e SUDEP em quatro pacientes com epilepsia idiopática generalizada. De acordo com o que observamos em nosso estudo, seria plausível sugerir que o tratamento com a CBZ e LTG pode reduzir os efeitos da epilepsia no sistema cardiovascular. Este efeito benéfico das DAEs poderia ser devido a diminuição de frequência de crises ou por algum mecanismo molecular, ainda desconhecido, desses fármacos no coração. Entretanto, ao considerar os expostos dos estudos citados acima, uma segunda linha de raciocínio pode ser mencionada, sugerindo um efeito de adaptação do coração à epilepsia, mascarando os reais efeitos das DAEs nas respostas cardiovasculares. (155-158)

De fato, estudos revelam que muitas DAEs atuam predominantemente em canais para sódio dependentes de voltagem e, um aspecto interessante é que, drogas que normalmente são consideradas como bloqueadoras de canais para sódio, como CBZ e LTG, também inibem o canal para cálcio de alto limiar. Como ambos canais são expressos tanto no cérebro quanto no coração e se há ação das DAEs nos diferentes subtipos desses canais, é plausível hipotetizar que o uso de DAEs tornaria possível a causa de alterações não só do tecido cerebral como também do tecido cardíaco. Outros estudos relatam que DAEs parecem ser um fator de risco independente para a morte cardíaca súbita, especialmente nos pacientes que tomam DAEs que visam os canais para sódio dependentes de voltagem (91,120-122).

Pessoas com epilepsia frequentemente exibem alterações adquiridas ou genéticas de canais iônicos voltagem dependentes que são expressos no coração e no cérebro. Neste contexto, foram encontrados distúrbios significativos de propriedades elétricas em cardiomiócitos de roedores com epilepsias adquiridas ou genéticas. Por exemplo, Biet et. al. mostraram que a epilepsia adquirida induz um remodelamento molecular do ventrículo cardíaco caracterizado pela expressão de canais para sódio do tipo neuronal (NaV1.1) levando a uma duração prolongada do potencial de ação cardíaco e provavelmente a um prolongamento do intervalo QT. Outra observação desse estudo foi uma quantidade diminuída de mRNA NaV1.5 mas, com duplicação da proteína expressa em células de animais epiléticos. Uma sugestão abordada pelos autores é que, a redução do mRNA NaV1.5 é compensada por uma internalização mais lenta (reciclagem) das proteínas maduras expressas na superfície dos cardiomiócitos, indicando assim, que a epilepsia pode agir alterando diretamente a expressão gênica e o tráfico de proteínas. Os achado desse estudo se associado a estudos anteriores que mostraram que as condições epiléticas aumentam a expressão de NaV1.1 no hipocampo cerebral sugerem que mecanismos de adaptação semelhantes, mas ainda desconhecidos, à epilepsia existem tanto no cérebro quanto no coração.

Em camundongos um modelo de síndrome de Dravet, uma forma grave de epilepsia infantil com alta mortalidade que é comumente causada por mutações heterozigóticas em NaV1.1, os miócitos ventriculares exibiram um aumento nas correntes de sódio dependentes de voltagem. Essas alterações

foram associadas a uma excitabilidade aumentada, um prolongamento da duração do potencial de ação e um aumento na atividade desencadeada de cardiomiócitos. Estes exemplos ilustram bem as possíveis modificações das propriedades cardíacas ao nível da expressão gênica em modelos animais de epilepsia, mas também demonstram dificuldades na previsão de possíveis consequências de tais alterações para efeitos de DAE. (139-145)

Na prática clínica, as pessoas com epilepsia muitas vezes tomam mais de um DAE para conseguir um melhor controle de crises. Em estudo realizado para avaliar o encurtamento de cardiomiócitos isolados, três DAEs foram utilizadas (CBZ, LTG e LEV) (164). Eles observaram que as três DAEs isoladamente reduziram reversivelmente as amplitudes de encurtamento de cardiomiócitos, e que, a combinação dos três medicamentos levou à falha do acoplamento eletromecânico em 42% das células. Assim, é importante salientar a necessidade de mais estudos que avaliem o tratamento associado DAEs.

Outro aspecto ao qual se deve atenção é o contexto de intoxicação com DAE, em que já foi demonstrado que níveis plasmáticos elevados de CBZ (acima de 40 mmol / l) foi um fator de risco para SUDEP, apontando para os riscos associados à epilepsia grave instável. Outros exemplos são a insuficiência miocárdica relatada no contexto da intoxicação por CBZ, um bloqueio atrioventricular completo após uma sobredosagem de LTG, e a ocorrência de disfunção do nó sinusal, fibrilação atrial, bloqueio atrioventricular ou taquicardia ventricular em associação com o uso combinado de DAE bloqueadora de canais para sódio (148-154).

No entanto, alguns estudos clínicos sugerem que CBZ, em níveis terapêuticos, não tem efeitos sobre o sistema de condução do coração, apoiando a sua utilização segura na ausência de doença cardíaca. Neste sentido, já foi descrito que a suspensão abrupta da CBZ leva a um aumento da atividade simpática no sono como evidenciado por alterações na VFC, sugerindo que o aumento da atividade simpática no ambiente de hipóxia induzida por convulsão poderia predispor a SUDEP (23,146,147).

Assim, nossos resultados, apontam no sentido de que quando feito maneira correta e supervisionada o tratamento com DAEs pode prevenir alterações cardiovasculares induzidas pela epilepsia.

6-CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que ratos com epilepsia apresentam parâmetros cardiovasculares de repouso (PAS; PAD; PAM; FC) mais elevados que ratos sem epilepsia. Também mostra que o tratamento crônico da epilepsia com CBZ ou LTG pode reverter essas alterações dos parâmetros cardiovasculares de repouso. Isto foi demonstrado através da redução da PAS, PAM e FC de repouso de animais com epilepsia após o tratamento com CBZ, bem como, a redução da FC de repouso após tratamento com LTG. Além disso, os animais com epilepsia também apresentam uma maior AST de cardiomiócitos e acúmulo de colágeno perivascular. Nosso estudo mostra que o tratamento com CBZ ou LTG foi capaz de reduzir a AST de cardiomiócitos a tamanhos equivalentes a ratos sem epilepsia, e o tratamento com CBZ também reduziu o acúmulo de colágeno perivascular dos animais.

Nossos dados indicam, que o tratamento com DAEs podem auxiliar na prevenção de alterações cardiovasculares causadas pela epilepsia. Tais resultados agregam em um maior entendimento no campo da epilepsia e, com novas pesquisas poderá garantir, com a prevenção de alterações cardiovasculares, uma melhor qualidade de vidas aos pacientes com epilepsia. Neste contexto, elucidar os mecanismos pelo qual as DAEs agem no sistema cardiovascular e se com a politerapia os efeitos são semelhantes, tornam-se passos importantes a serem seguidos neste campo de pesquisa.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moreira SRG. Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico e tratamento. *Mental*. 2004;(32):107–22.
2. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. v. 46, n. 4, p. 470–2, Apr 2005.
3. Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015.
4. 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*. v. 55, n. 4, p. 475-82, 2014.
5. Halatchev VN. Epidemiology of epilepsy - recent achievements and future. *Folia Med (Plovdiv)* v. 42, n. 2, p. 17-22, 2000.
6. Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet* v. 367, p. 1087-1100, 2006.
7. Lorenzato RZ, Cavalli RC, Duarte G, Sakamoto AC, Mauad Filho F, Nogueira AA, Cunha SP. Epilepsia e gravidez: evolução e repercussões. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 24, n. 8, p. 521-526, set. 2002.
8. Wickler MIB, Rotta NT. Epilepsia in: Ferreira J.P. (Org.) *Pediatria. Diagnóstico e Tratamento*, 2004.
9. Guerreiro C. A. et al. *Epilepsia*. São Paulo: Lemos, 2000. 120 p.
10. Goldman L, Ausiello D. *Tratado de medicina Interna*. (23ª ed.). Espanha, Elsevier, 2010.
11. Shorvon SD. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*. v 52, n 6, 1052-7, 2011.

12. Dreifuss FE, Bancaud J, Henriksen O, Rubio-Donnadieu F. Proposal for Revised Clinical and electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures. *Epilepsia*. v 22:489–501, 1981.
13. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Boas WE, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*; v 51, n 4, p 676–85, 2010.
14. Robalo VAV. Caracterização do padrão de utilização de carbamazepina no Centro de Saúde de Ponta d'Água. Cidade da Praia. p.90, 2014.
15. Guerreiro CAM, Guerreiro M. *Epilepsia*. Editora de Projetos Médicos (EPM), 2004.
16. Lowenstein DH. Convulsiones y epilepsia. In: Harrisson, T.R. *Princípios de medicina Interna*. 18ª ed. Mexico: Mc Graw Hill Interamericana, 2012.
17. Valente KDR, Thome-Souza S, Kuczynski E, Negrão N. Depressão em crianças e adolescentes com epilepsia. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 31, n. 6, p. 290-299, 2004.
18. Rizaldu JJ. *Epilepsias*. In: Farreras, V & Rozman, C. *Medicina Interna*, 17ª ed. España: Elsevier, 2012.
19. Dasmasceno, DD; Saverginini, QS; Gomes, RME; Guatimosim, S; Ferreira, AJ; Doretto, APA. Cardiac dysfunction in rats prone to audiogenic epileptic seizures. *Seizure*. v.22, p. 259-66, 2013.
20. Katsiki, N; Mikhailidis, DP; Nair, DR. The effects of antiepileptic drugs on vascular risk factors: A narrative review. *Epilepsy*, 2014.
21. Kotsopoulos IAW, Van Merode T, Kessels FGH, De Krom MCTFM, Knottnerus JA. Systematic Review and Meta-analysis of Incidence Studies of Epilepsy and Unprovoked Seizures. *Epilepsia*. v 43, n 11, p 1402–9, Nov 2002.
22. Bell GS, Sander JW. The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. *Seizure*. v 10, n 4, p 306–14; Jun 2001.
23. Carpio A, Hauser WA. Epilepsy in the developing world. *Curr Neurol Neurosci Rep*. v 9, n 4, p 319–26, Jul 2009.
24. Leonardi M, Ustun TB. The global burden of epilepsy. *Epilepsia*. v 43 Suppl 6:21–5, Jan 2002.

25. Neto, J; Marchetti, R. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados á epilepsia. *Rev Bras Psiquiatr.* v 27, n 4, p 323-8, 2005.
26. Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol.* v 16, n 2, p 165–70, 2003.
27. Scott RA, Lhatoo SD, Sander JW. The treatment of epilepsy in developing countries: where do we go from here? *Bull World Health Organ.* v 79, n 4, p 344–51, Jan 2001.
28. Tomson, T; Walezak, T; Sillanpaa, M; Sander, JWAS. Sudden unexpected death in epilepsy: a review of incidence and risk factors. *Epilepsia*, v. 46, p.54-61, 2005.
29. Andrade-Valença LPA, Valença MM, Velasco TR, Leite JP. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* v 12, n 1, p 31–6, 2006.
30. Sharma AK, Reams RY, Jordan WH, Miller MA, Thacker HL, Snyder PW. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol.* v 35, n 7, p 984–99, 2007.
31. Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology.* v 51, n 5, p 1256–62, Nov 1998.
32. 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.* v 42, n 6, p 796-803, Jun 2001.
33. 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.* v 34, n 6, p 774-80, Dez 1993.
34. Spencer SS. Neuronal networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment. *Epilepsia.* v 43, n 3, p 219-27, 2002.
35. Yu, T; Zhang, G; Kohrman, MH; et al. A retrospective study comparing preoperative evaluations and postoperative outcomes in paediatric and adult patients undergoing surgical resection for refractory epilepsy. *Seizure*, v. 21, p. 444-449, 2012.

36. 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*. v 46, n 8, p 1273-9, 2005.
37. Malmgren K, Thom M. Hippocampal sclerosis--origins and imaging. *Epilepsia*. v 53, Suppl 4:19-33, Sep 2012.
38. Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, et al. Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology*. v 43, n 6, p 1083-7, Jun 1993.
39. Aliashkevich, AF; Yilmazer-Hanke, D; Van Roost, D; Mundhenk, B; Schramm, J; Blumcke, I. Cellular pathology of amygdala neurons in human temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol (Berl)* v 106, p 99-106, 2003.
40. Babb, TL, Najm, I. Hippocampal Sclerosis. Wyllie, E. (Ed.) *The Treatment of Epilepsy*, 1 Ed. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, Philadelphia, p. 105-114, 2001.
41. Wieser, HG. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* v 45, p 695-714, 2004.
42. Wieser, HG; Hajek, M; Gooss A; Aguzzi, A. Mesial temporal lobe epilepsy syndrome with hippocampal and amygdala sclerosis. Oxbury JM, Polkey CE, Duchowny M (Eds.) *Intractable Focal Epilepsy*, first Ed. W.B.SAUNDERS, London, p 131-158, 2000.
43. Wieser, HG; Ortega, M; Friedman, A; Yonekawa, Y. Long-term seizure outcomes following amygdalohippocampectomy. *J Neurosurg* v 98, p 751-763, 2003.
44. Wieser, HG., Williamson, PD. Ictal Semiology. Engel J Jr. (Ed.) *Surgical Treatment of the Epilepsies*, 2 Ed. Raven Press, New York, p 161-171, 1993.
45. Panayiotopoulos, CP. Symptomatic and probably symptomatic focal epilepsies. Panayiotopoulos, C.P. (Ed.) *A Clinical Guide to Epileptic Syndromes and their Treatment*. BLADON MEDICAL PUBLISHING, United Kingdom, p 169-213, 2002.
46. Fried, I; Spencer, DD; Spencer, SS. The anatomy of epileptic auras: focal pathology and surgical outcome. *J Neurosurg* v 83, p 60-66, 1995.

47. Henkel, A; Noachtar, S; Pfander, M; Luders, HO. The localizing value of the abdominal aura and its evolution: a study in focal epilepsies. *Neurology* v 58, p 271-276, 2002.
48. Cendes, F; Andermann, F; Gloor, P; Gambardella, A; Lopes-Cendes, I; Watson, C; Evans, A;; Carpenter, S. Relationship between atrophy of the amygdala and ictal fear in temporal lobe epilepsy. *Brain* v 117, p 739-746, 1994.
49. Fried, I. Auras and experiential responses arising in the temporal lobe. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* v 9, p 420-428, 1997.
50. Palmini, A; Gloor, P. The localizing value of auras in partial seizures: a prospective and retrospective study. *Neurology* v 42, p 801-808, 1992.
51. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. v 51, n 6, p 1069–77, Jun 2010.
52. Perucca E. An introduction to antiepileptic drugs. *Epilepsia*. v 46, n 4, p 31-7, 2005.
53. Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*. v 14, n 4, p 511-7, 1990.
54. Blümcke I, Beck H, Lie AA, Wiestler OD. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. v 6, n 2, p 205-23, Sep 1999.
55. Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci*. v 16, n 1-2, p 33-7, 1995.
56. Curia, G. et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods*, v 172, n 2, p.143–157, 2008.
57. 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*. v 9, n 3, p 315–35, 1983.
58. Scorza, F. a et al. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v 81, n 3, p.345–365, 2009.

59. 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*. v 32, n 6, p 778-82, 1991.
60. 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*. v 34, n 6, p 985-95, 1993.
61. Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, et al. Disruption of the *thm1* receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. v 94, p 13311–16, 1997.
62. 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*. v 121, n 6, p 1171-9, 1997.
63. Nagao T, Alonso A, Avoli M. Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. *Neuroscience*. v 72, n 2, p 399-408, 1996.
64. Yacubian EMT. Eficácia e Efeitos Adversos dos Fármacos Antiepilépticos. LBE, 2017.
65. Errami M, et al. Carbamazepine alone and in combination with doxycycline attenuates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Heart International*. v 5, n 7, p 27-32, 2010.
66. 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 v 68, n 3, p 167-207, Oct 2008.
67. Gaitatzis A, Sander JW. The mortality of epilepsy revisited. *Epileptic Disord*. v 6, n 1, p 3-13, 2004.
68. Nashef, L. Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions. *Epilepsia*. v.38 p.1528-57, 1997.
69. Jeppesen, J; Frederiksen, AF; Brugada, R; Pedersen, B; Pedersen, GR; Johansen, P; Beniczky, S. Heart rate variability analysis indicates pre-ictal parasympathetic overdrive preceding seizure-induced cardiac

- dysrhythmias leading to sudden unexpected death in a patient with epilepsy. *Epilepsia*. v.55. p.67–71, 2014.
70. Colugnati, DB; Arida, RM; Cysneiros, RM; Terra, VC; Sonoda, EYF; Pansani, AP; Scorza, CA; Cavalheiro, EA; Scorza, FA. Carbamazepine does not alter the intrinsic cardiac function in rats with epilepsy. *Arq. Neuro-Psiquiatr*, v.68 , n.4, p. 573-578, 2010.
71. Dupuis, M; Rijckevorsel, KV; Evrard, F; Dubuisson, N; Dupuis, F; Robays, PV. Takotsubo syndrome (TKS): A possible mechanism of sudden unexplained death in epilepsy (SUDEP). *Seizure, Elsevier*, v.21, p.51-54, 2012.
72. Elson, L. S. What is known about the mechanisms under lying SUDEP?, *Epilepsia*, v. 49, p.93–98, 2008.
73. Scorza, FA; et al. Cardiovascular alterations and sudden death in epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr.*, v. 65, n. 2-B, p. 461 – 466, 2007.
74. Opherk C, Coromilas J, Hirsch LJ. Heart rate and EKG changes in 102 seizures: analysis of influencing factors. *Epilepsy Res* v 52 p 117-27, 2002.
75. Sato K, Shamoto H, Yoshimoto T. Severe bradycardia during epilepsy surgery. *J Neurosurg Anesthesiol*. v 13, p 329-32, 2001.
76. Sinha PK, Neema PK, Manikandan S, Unnikrishnan KP, Rathod RC. Bradycardia and sinus arrest following saline irrigation of the brain during epilepsy surgery. *J Neurosurg Anesthesiol*. v 16, p 160-3, 2004.
77. Nashef L, Walker F, Allen P, Sander JW, Shorvon SD, Fish DR. Apnoea and bradycardia during epileptic seizures: relation to sudden death in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. v 60, p 297-300, 1996.
78. Bybee KA, Kara T, Prasad A, Lerman A, Barsness GW, Wright RS, Rihal CS. Systematic review: transient left ventricular apical ballooning: a syndrome that mimics ST-segment elevation myocardial infarction. *Ann Intern Med*; v 141, p 858-65, 2004.
79. Surges R, Scott CA, Walker MC. Enhanced QT shortening and persistent tachycardia after generalized seizures. *Neurology*; v 74, p 421-6, 2010.
80. Colugnati DB, Arida RM, Cravo SL, Schoorlemmer GH, de Almeida AC, Cavalheiro EA, Scorza FA. Hibernating mammals in sudden cardiac

- death in epilepsy: what do they tell us? *Med Hypotheses*; v 70, p 929-32, 2008.
81. Colugnati DB, Gomes PA, Arida RM, de Albuquerque M, Cysneiros RM, Cavalheiro EA, Scorza FA. Analysis of cardiac parameters in animals with epilepsy: possible cause of sudden death?. *Arq Neuropsiquiatr*; v 63, p 1035-41, 2005.
82. Nei M. Cardiac effects of seizures. *Epilepsy Curr*. v 9, n 4, p 91-5, 2009.
83. 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*. v 51, n 5, p 738-44, 2010.
84. Devinsky O. Effects of Seizures on Autonomic and Cardiovascular Function. *Epilepsy Curr*. v 4, n 2, p 43-46, 2004.
85. Tomson T, Nashef L, Ryvlin P. Sudden unexpected death in epilepsy: current knowledge and future directions. *Lancet Neurol.*; v 7, n 11, p 1021-31, 2008.
86. Tomson T, Ericson M, Ihrman C, Lindblad LE. Heart rate variability in patients with epilepsy. *Epilepsy Res*. v 30, n 1, p 77-83, 1998.
87. 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*; v 76, n 10, p 1382-6, 2005.
88. 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*; v 124, n 12, p 2372-82, 2001.
89. Kloster R, Engelskjøn T. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP): a clinical perspective and a search for risk factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; v 67, p 439-444, 1999.
90. Falconer Be, Rajs J. Post-mortem findings of cardiac lesions in epileptics: a preliminary report. *Forensic Sci*; v 8, p 63-71, 1976.
91. Antoniuk SA, Oliva LV, Bruck I, Malucelli M, Yabumoto S, Castellano JL. Sudden unexpected, unexplained death in epilepsy autopsied patients. *Arq Neuropsiquiatr*; v 59, n 1, p 40-5, 2001.

92. Natelson BH, Suarez RV, Terrence CF, Turizo R. Patients with epilepsy who die suddenly have cardiac disease. *Arch Neurol*; v 55, n 6, p 857-60, 1998.
93. Opeskin K, Thomas A, Berkovic SF. Does cardiac conduction pathology contribute to sudden unexpected death in epilepsy? *Epilepsy Res*; v 40, n 1, p 17-24, 2000.
94. Bardai, A; Blom, MT; Noord, C; Verhamme, KM; Sturkenboom, MCJ; Tan, HL. Sudden cardiac death is associated both with epilepsy and with use of antiepileptic medications. *Heart*. v.101. p.17-22, 2015.
95. Dale, CH; Tomson, T; Benn, E; Sander, JW; Nilsson, L; Langan, Y; Walczak, TS; Beghi, E; Brodie, MJ; Hauser, WA; ILAE Commission on Epidemiology. Do antiepileptic drugs or generalized tonic-clonic seizure frequency increase SUDEP risk? A combined analysis. *Epilepsia*, v.53, p.249–252, 2012.
96. Ferlisi, M; Tomei, R; Carletti, M; Moretto, G; Zanoni, T. Seizure induced ventricular fibrillation: A case of near-SUDEP. *Seizure*, Elsevier, v. 22, p. 249-251, 2013.
97. Kinga, KB; Banach, M. Antiarrhythmic drugs and epilepsy - Review article. *Pharmacological Reports*. v.66, p. 545–51, 2014.
98. Hesdorffer DC, Tomson T. Sudden unexpected death in epilepsy. Potential role of antiepileptic drugs. *CNS Drugs*. 2013 Feb;27(2):113-9.
99. McNamara, JO. Farmacoterapia das epilepsias. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A. G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2006. p. 445-468.
100. Moreno, RA; Moreno, DH; Soares, MBM; Ratzke, R. Anticonvulsivantes e antipsicóticos no tratamento do transtorno bipolar. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 26, suppl. 3, p. 37-43, out. 2004.
101. Katzung, BG. *Farmacologia: básica & clínica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.337, 2010.
102. Gouvinhas, C; Pereira, J; Pereira, L. Carbamazepina - Toxicologia e Análises Toxicológicas. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Trabalho Acadêmico, 2005.
103. Ford, M; Delaney, KA; Ling, L. *Clinical Toxicology*. 1ª edição. Saunders, 2001.

104. Guimarães, S; et al. Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. (5ª edição). Porto, Porto Editora, 2006.
105. Dhande, P; Gonarkar, S; Sanghavi, D; Pandit, V. Add-on Effect of Levetiracetam on Cognitive Activity of Carbamazepine and Topiramate Treated Healthy Rat. Journal of Clinical and Diagnostic Research. v.9, p.6, 2015.
106. USP - United Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia, ed. 30, p 2675, 2007.
107. Goodman, L; Gilman, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 8ª edição. McGraw-Hill, Madrid. 1991.
108. Guimarães, S; et al. Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. (5ª edição). Porto, Porto Editora, 2006.
109. Löscher, W; Hoenack, D. Intravenous carbamazepine: comparison of different parenteral formulations in a mouse model of convulsive status epilepticus. Epilepsia. v.38, n.1, p.106-13, 1997.
110. Araújo, D; Freitas, R. Carbamazepina: uma revisão da literatura. Revista Eletrônica de Farmácia. v 7, n 4, p 30-45, 2010.
111. Lima, DR. Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda., v.2, p. 2240, 2003.
112. Perucca, E; Tomson, T. The pharmacological treatment of epilepsy in adults. Lancet Neurology, v.10, n.5, p.446-56, 2011.
113. Singh, E; Pillai, KK; Mehndiratta, M. Characterization of a Lamotrigine-Resistant Kindled Model of Epilepsy in Mice: Evaluation of Drug Resistance Mechanisms. Nordic Association for the Publication of Basic e Clinical Pharmacology e Toxicology, 2014.
114. Wong, ICK; Mawer, GE; Sander, JWAS. Adverse event monitoring in lamotrigine patients: a pharmacoepidemiologic study in the United Kingdom. Epilepsia, Copenhagen, v.42, n.2, p.237-44, 2001.
115. Gram, L. Pharmacokinetics os new antiepileptic drugs. Epilepsia, New York, v.37, n.6, p.12-16, 1996.
116. Grasela, TH; Fiedler-Kelly, J; Cox, E; Womble, GP; Risner, ME; Chen, C. Population pharmacokinetics of lamotrigine adjunctive therapy

- in adults with epilepsy. *The Journal of Clinical Pharmacology*, Stamford, v.39, n.4, p.373-84, 1999.
117. Rambeck, B; Wolf, P. Lamotrigine clinical pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, New York, v.25, n..6, p.433-43, 1993.
118. Johannessen, SI; Landmark, JC. Antiepileptic Drug Interactions - Principles and cllinical Implications. *Current Neuropharmacology*, San Franncisco, v.8, p.254-67, 2010.
119. Beyenburg, S; Bauer, J; Reuber, M. New drugs for the treatment of epilepsy: a practical approuach. *Postgratuante Medical Journal*, Oxford, v. 948, n.80, p.581-87, 2004.
120. Kwan, P; Sills, GJ; Brodie, MJ. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drug. *Pharmacology and Therapeutic*, Oxford, v.90, p.21-34, 2001.
121. Matsuo F. Lamotrigine. *Epilepsia*, New York, v.44, n.5, p.30-36, 1999.
122. Pellock, J.M. The clinical efficacy of lamotrigine as an antiepileptic drug. *Neurology*, New York, v.44, n.11, p.529-35, 1994.
123. Hookana E, Ansakorpi H, Kortelainen ML, Junttila MJ, Kaikkonen KS, Perkiömäki J, et al. Antiepileptic medications and the risk for sudden cardiac death caused by an acute coronary event: a prospective case-control study. v 48, p 111–7, 2016.
124. Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain* v 129, p 18–35, 2006.
125. Surges R, Volynski KE, Walker MC. Is levetiracetam different from other antiepileptic drugs? Levetiracetam and its cellular mechanism of action in epilepsy revisited. *Ther Adv Neurol Disord* v 1, p13–24, 2008.
126. Parent, J. M. et al. Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, v 59, n 1, p 81–91, Jan. 2006.
127. Opherk, C., Coromilas, J., Hirsch, L.J. Heart rate and EKG changes in 102 seizures: analysis of influencing factors. *Epilepsy Res.* v 52, n 2, p 117—127, 2002.
128. Lotufo PA, Valiengo L, Bense~nor IM, et al. A systematic review and meta-analysis of heart rate variability in epilepsy and antiepileptic drugs. *Epilepsia.* v 53, p 272–282, 2012.

129. Zijlmans M, Flanagan D, Gotman J. Heart rate changes and ECG abnormalities during epileptic seizures: prevalence and definition of an objective clinical sign. *Epilepsia*. v 43, p 847–54, 2002.
130. So EL. What is known about the mechanisms underlying SUDEP? *Epilepsia*. v 49, n 9, p 93–8, 2008.
131. Drake ME, Reider CR, Kay A. Electrocardiography in epilepsy patients without cardiac symptoms. *Seizure*. 1993;2(1):63–5.
132. Tolstykh GP, Cavazos JE. Potential mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsy Behav*. v 26, n 3, p 410–4, 2013
133. Seyal M, Pascual F, Lee CYM, Li CS, Bateman LM. Seizure-related cardiac repolarization abnormalities are associated with ictal hypoxemia. *Epilepsia*. v 52, n 11, p 2105–11, 2011.
134. Tavernor SJ, Brown SW, Tavernor RME, Gifford C. Electrocardiograph QT lengthening associated with epileptiform EEG discharges - A role in sudden unexplained death in epilepsy? *Seizure*. v 5, n 1, p 79–83, 1996.
135. Nei M, Ho RT, Sperling MR. EKG abnormalities during partial seizures in refractory epilepsy. *Epilepsia*. v 41, n 5, p 542–8 2000.
136. Tigarán S, Rasmussen V, Dam M, Pedersen S, Høgenhaven H, Friberg B. ECG changes in epilepsy patients. *Acta Neurol Scand*. v 96, n 2, p 72–5, 1997.
137. Dogan EA, Dogan U, Yildiz GU, Akilli H, Genc E, Genc BO, et al. Evaluation of cardiac repolarization indices in well-controlled partial epilepsy: 12-Lead ECG findings. *Epilepsy Res*. v 90, n 1-2, p 157–63, 2010.
138. Difrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res*. v 106, n 3, p 434–46, 2010.
139. Guimarães S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev*. v 53, n 2, p 319–56, 2001.
140. Hesdorffer DC, Tomson T, Benn E, Sander JW, Nilsson L, Langan Y, et al. Do antiepileptic drugs or generalized tonic-clonic seizure frequency increase SUDEP risk? A combined analysis. *Epilepsia*. v 53, p 249–52, 2012.
141. Tomson T, Hirsch LJ, Friedman D, Bester N, Hammer A, Irizarry M, et al. Sudden unexpected death in epilepsy in lamotrigine randomized-controlled trials. *Epilepsia* (2013) 54:135–40.
142. Surges R, Sander JW. Sudden unexpected death in epilepsy: mechanisms, prevalence, and prevention. *Curr Opin Neurol*. v 25, p 201–7, 2012.
143. Ravindran K, Powell KL, Todaro M, O'Brien TJ. The pathophysiology of cardiac dysfunction in epilepsy. *Epilepsy Res*. v 127, p 19–29, 2016.
144. Biet M, Morin N, Lessard-Beaudoin M, Graham RK, Duss S, Gagné J, et al. Prolongation of action potential duration and QT interval during epilepsy linked to increased contribution of neuronal sodium channels to cardiac late Na⁺ current: potential mechanism for sudden death in epilepsy. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. v 8, p 912–20, 2015.

145. Auerbach DS, Jones J, Clawson BC, Offord J, Lenk GM, Ogiwara I, et al. Altered cardiac electrophysiology and SUDEP in a model of Dravet syndrome. *PLoS One*. v 8, 2013.
146. Thompson CH, Kahlig KM, George AL Jr. SCN1A splice variants exhibit divergent sensitivity to commonly used antiepileptic drugs. *Epilepsia*. v 52, p 1000–9, 2011.
147. Qiao X, Sun G, Clare JJ, Werkman TR, Wadman WJ. Properties of human brain sodium channel α -subunits expressed in HEK293 cells and their modulation by carbamazepine, phenytoin and lamotrigine. *Br J Pharmacol*. v 171, p 1054–67, 2014.
148. Xie X, Lancaster B, Peakman T, Garthwaite J. Interaction of the antiepileptic drug lamotrigine with recombinant rat brain type IIA Na⁺ channels and with native Na⁺ channels in rat hippocampal neurones. *Pflugers Arch*. v 430, p 437–46, 1995.
149. Stollberger C, Finsterer J. Cardiorespiratory findings in sudden unexplained/unexpected death in epilepsy (SUDEP). *Epilepsy Res*. v 59, p 51-60, 2004
150. Hennessy MJ, Tighe MG, Binnie CD, Nashef L. Sudden withdrawal of carbamazepine increases cardiac sympathetic activity in sleep. *Neurology*. v 57, p 1650-54, 2001.
151. Nilsson L, Bergman U, Diwan V, Farahmand BY, Persson PG., Tomson T. Antiepileptic drug therapy and its management in sudden unexpected death in epilepsy: a case-control study. *Epilepsia*. v 42, p 667-673, 2007.
152. Faisy C, Guerot E, Diehl JL, Rezgoui N, Labrousse J. Carbamazepine-associated severe left ventricular dysfunction. *J Toxicol Clin Toxicol*. v 38, p 339–42, 2000.
153. French LK, McKeown NJ, Hendrickson RG. Complete heart block and death following lamotrigine overdose. *Clin Toxicol (Phila)*. v 49, p 330–3, 2011.
154. Nizam A, Mylavarapu K, Thomas D, Briskin K, Wu B, Saluja D, et al. Lacosamide-induced second-degree atrioventricular block in a patient with partial epilepsy. *Epilepsia*. v 52, p 153–5, 2011.
155. Chinnasami S, Rathore C, Duncan JS. Sinus node dysfunction: an adverse effect of lacosamide. *Epilepsia*. v 54, p 90–3, 2013.
156. DeGiorgio CM. Atrial flutter/atrial fibrillation associated with lacosamide for partial seizures. *Epilepsy Behav*. v 18, p 322–4, 2010.
157. DeGiorgio AC, Desso TE, Lee L, DeGiorgio CM. Ventricular tachycardia associated with lacosamide co-medication in drug-resistant epilepsy. *Epilepsy Behav Case Rep*. v 1, p 26–8, 2012.
158. Isojarvi JI, Ansakorpi H, Suominen K, Tolonen U, Repo M, Myllyl aVV. Interictal cardiovascular autonomic responses in patients with epilepsy. *Epilepsia*. v 39, p 420–426, 1998.
159. Kenneback G, Ericson M, Tomson T, Bergfeldt L. Changes in arrhythmia profile and heart rate variability during abrupt withdrawal of antiepileptic drugs. Implications for sudden death. *Seizure*, v 6, p 369–375 1997.

160. Danielsson BR, Lansdell K, Patmore L, Tomson T. Effects of the antiepileptic drugs lamotrigine, topiramate and gabapentin on hERG potassium currents. *Epilepsy Res.* v 63, p 17–25, 2005.
161. Aurlien D, Taubøll E, Gjerstad L. Lamotrigine in idiopathic epilepsy – increased risk of cardiac death? *Acta Neurol Scand.* v 115, p 199–203, 2007.
162. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* v 32, n 3, p 281-94, 1972.
163. Nilsen, KB, Haram, M., Tangedal, S., Sand, T., Brodtkorb, E.. Is elevated pre-ictal heart rate associated with secondary generalization in partial epilepsy? *Seizure* v 19, p 291–295, 2010.
164. Son WH, Hwang WS, Koo DL, et al. The Difference in Heart Rate Change between Temporal and Frontal Lobe Seizures during Peri-ictal Period. *Journal of Epilepsy Research.* v 6, n 1, p 16-21, 2016.
165. Poonam V, Turagam M, Laurence T, Kocheril A. Cardiac Arrhythmias and Sudden Unexpected Death in Epilepsy (SUDEP). *Pacing Clin Electrophysiol.* v 35, p 1–8, 2011.
166. Shiozaki AA, Senra T, Arteaga E, Pita CG, Martinelli Filho M, Ávila LFR, et al. Myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy and high risk for sudden death. *Arq Bras Cardiol.* v 94, n 4, p 535–40, 2010.
167. Hulbert J, Elger CE, Meyer R, Surges R. Antiepileptic Drugs Impair Shortening of Isolated Cardiomyocytes. *Frontiers in Neurology.* v 8, n 133, 2017.
168. Sevcencu C, Struijk JJ. Autonomic alterations and cardiac changes in epilepsy. *Epilepsia.* 2010;51(5):725–37.
169. Surges R, Henneberger C, Adjei P, Scott CA, Sander JW, Walker MC. Do alterations in inter-ictal heart rate variability predict sudden unexpected death in epilepsy?
170. Rajendra AU, Paul JK, Kannathal N, Lim CM, Suri JS. Heart rate variability: a review. *Med Bio Eng Comput.* v 44, n 12, p 1031-51, 2006.
171. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation.* v 93, n 5, p 1043-65, 1996.
172. Godoy MF, Takakura IT, Correa PR. Relevância da análise do comportamento dinâmico não-linear (Teoria do Caos) como elemento prognóstico de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica. *Arq Ciênc Saúde.* v 12, n 4, p 167-71, 2005.
173. Porta A. et al. Entropy, Entropy Rate, and Pattern Classification as Tools to Typify Complexity in Short Heart Period Variability Series. *IEEE Transaction on Bio-medical Engineering,* v 48, n11, p1282-91, 2001.

APÊNDICE

Variabilidade da Frequência Cardíaca

Alterações na FC, definidas como variabilidade da frequência cardíaca (VFC), são normais e esperadas e indicam a habilidade do coração em responder aos múltiplos estímulos fisiológicos e ambientais, dentre eles, respiração, exercício físico, estresse mental, alterações hemodinâmicas e metabólicas, sono e ortostatismo, bem como em compensar desordens induzidas por doenças (170).

De forma geral, a VFC descreve as oscilações dos intervalos entre batimentos cardíacos consecutivos (intervalos R-R) (Figura 17), que estão relacionadas às influências do SNA sobre o nódulo sinusal.

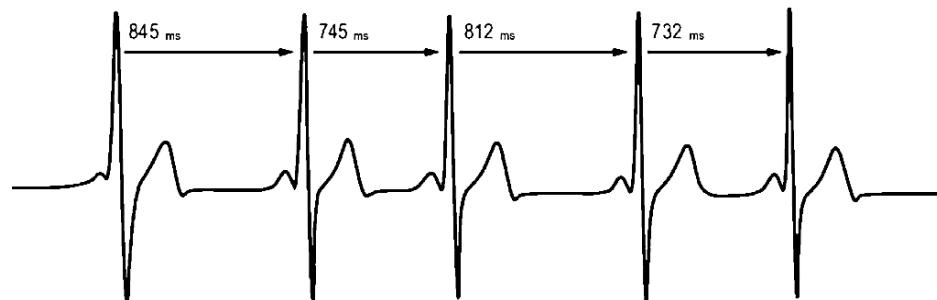


Figura 17 – Representação eletrocardiográfica de batimentos cardíacos (intervalos R-R). Tempo entre um batimento e outro expresso em milissegundos (ms).

Mudanças nos padrões da VFC fornecem um indicador sensível e antecipado de comprometimentos na saúde. Alta VFC é sinal de boa adaptação, caracterizando um indivíduo saudável com mecanismos autonômicos eficientes. Inversamente, baixa VFC é frequentemente um indicador de adaptação anormal e insuficiente do SNA, o que pode indicar a presença de mau funcionamento fisiológico no indivíduo, necessitando de investigações adicionais de modo a encontrar um diagnóstico específico (171).

Para análise da VFC, índices obtidos por meio de métodos lineares, no domínio do tempo e da frequência, e métodos não-lineares podem ser utilizados.

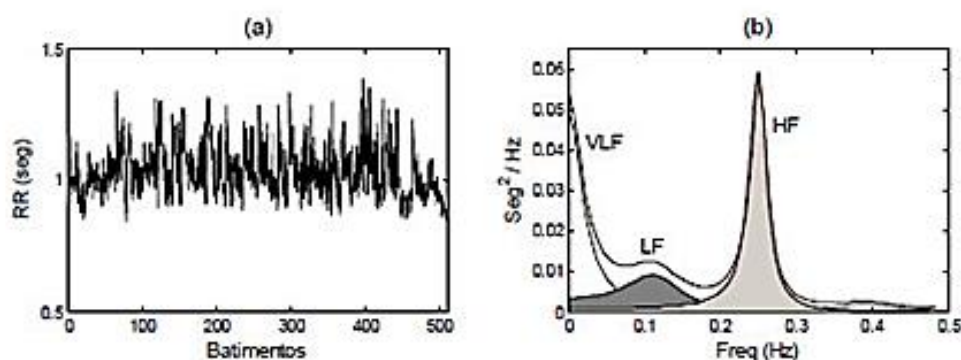
Os métodos lineares são divididos em dois tipos: análise no domínio do tempo, realizada por meio de índices estatísticos e geométricos, e análise no domínio da frequência.

Para a análise da VFC no domínio do tempo, assim denominada por expressar os resultados em unidade de tempo (milissegundos), mede-se cada intervalo RR normal (batimentos sinusais) durante determinado intervalo de tempo e, a partir daí, com base em métodos estatísticos ou geométricos (média, desvio padrão e índices derivados do histograma ou do mapa de coordenadas cartesianas dos intervalos RR), calculam-se os índices tradutores de flutuações na duração dos ciclos cardíacos (171).

Os índices estatísticos, no domínio do tempo, são obtidos pela determinação de intervalos RR correspondentes em qualquer ponto no tempo. Entre os índices que podem ser obtidos por essa análise estão: i) desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo, expresso em ms (SDNN); ii) raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, em um intervalo de tempo, expresso em ms (rMSSD). O índice SDNN, é obtido a partir de registros de longa duração e representa as atividades simpática e parassimpática, porém não permite distinguir quando as alterações da VFC são devidas ao aumento do tônus simpático ou à retirada do tônus vagal. Já o índice rMSSD representa a atividade parassimpática, pois é encontrado a partir da análise de intervalos RR adjacentes (170).

Outro método linear é o domínio da frequência, sendo a densidade de potência espectral a mais utilizada atualmente, quando se trata de estudos com indivíduos em condições de repouso. Esta análise decompõe a VFC em componentes oscilatórios fundamentais, sendo os principais: i) componente de alta frequência (High Frequency - HF), com variação de 0,15 a 0,4Hz, que corresponde à modulação respiratória e é um indicador da atuação do nervo vago sobre o coração; ii) componente de baixa frequência (Low Frequency - LF), com variação entre 0,04 e 0,15Hz, que é decorrente da ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração, com predominância do simpático; iii) relação LF/HF que reflete as alterações absolutas e relativas entre os componentes simpático e parassimpático do SNA, caracterizando o balanço simpato-vagal sobre o coração (170,171).

Para obtenção dos índices espectrais, o tacograma de frequência sofre processamento matemático, gerando um tacograma, gráfico que expressa a variação dos intervalos RR em função do tempo. O tacograma contém um sinal aparentemente periódico que oscila no tempo e que é processado por algoritmos matemáticos para obtenção de um espectro paramétrico. Exemplo de um tacograma e de um espectro estão contidos na Figura 18.



LEITE, Motricidade, 2013.

Figura 18 – (a): Tacograma de um indivíduo saudável (512 batimentos); (b): Espectro paramétrico e decomposição do espectro nas componentes VLF (branco), LF (cinza escuro) e HF (cinza claro).

Componentes de muito baixa frequência (Very Low Frequency - VLF) é menos utilizado cuja explicação fisiológica não está bem estabelecida e a normalização dos dados da análise espectral pode ser utilizada para minimizar os efeitos das alterações da banda de VLF. Essa normalização é determinada a partir da divisão da potência de um dado componente (LF ou HF) pelo espectro de potência total, subtraída do componente de VLF e multiplicada por 100 (170).

Adicionalmente aos métodos lineares, as teorias dos sistemas não-lineares têm sido progressivamente aplicadas para interpretar, explicar e prever o comportamento dos fenômenos biológicos. O comportamento não-linear é o que predomina nos sistemas humanos, em razão de sua natureza dinâmica complexa, a qual não pode ser descrita adequadamente por métodos lineares. Com isso, as teorias dos sistemas não-lineares são embasadas na teoria do Caos, que descreve elementos manifestando comportamentos que são

extremamente sensíveis às condições iniciais, dificilmente se repetem, mas apesar de tudo são determinísticos (172).

Uma das ferramentas não-lineares utilizadas, é baseada na análise simbólica de sequências de 3 tempos para distinguir a modulação cardíaca simpática e parassimpática. Este método de análise simbólica descrito e validado por Porta et al., 2001, consiste principalmente na transformação de uma série temporal (intervalos RR) em padrões curtos (3 batidas longas), sua classificação e avaliação de suas frequências de ocorrência (173).

O intervalo total das sequências é espalhado uniformemente em 6 níveis (de 0 a 5), e padrões de comprimento $L = 3$ são construídos como ilustrado na Figura 19. Todos os padrões possíveis são agrupados em 3 famílias referidas como: (i) padrões sem variação (3 símbolos iguais) - 0V caracterizado apenas por frequências muito lentas; (ii) padrões com 1 variação (2 símbolos subsequentes iguais e o símbolo restante diferente) - 1V caracterizado por algumas frequências lentas e muito lentas e (iii) padrões com 2 variações (todos os símbolos são diferentes do anterior) - 2LV- apenas por frequências lentas; 2UV- caracterizado por frequências mais rápidas. Exemplos destes padrões são fornecidos na Figura 20.

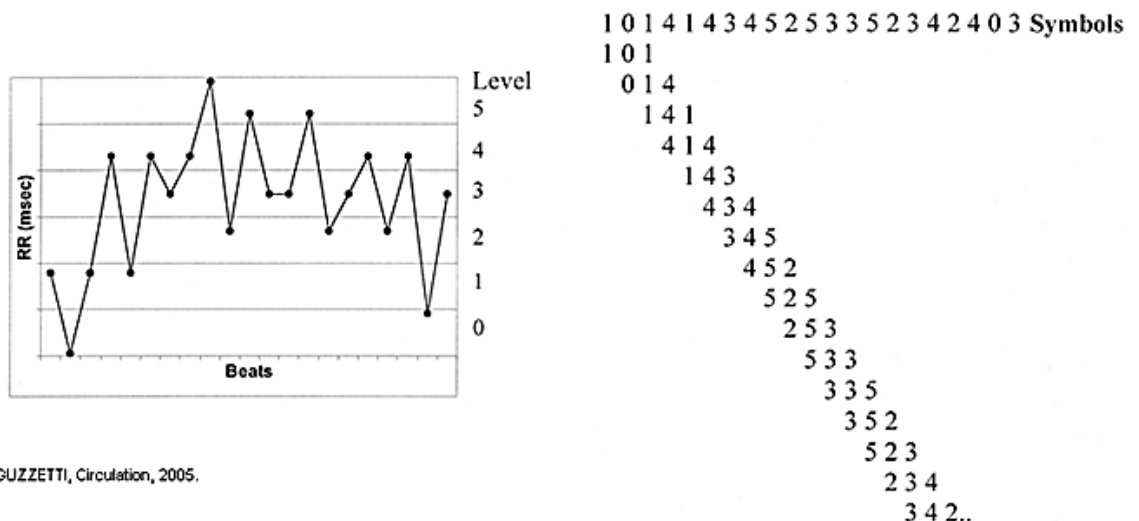
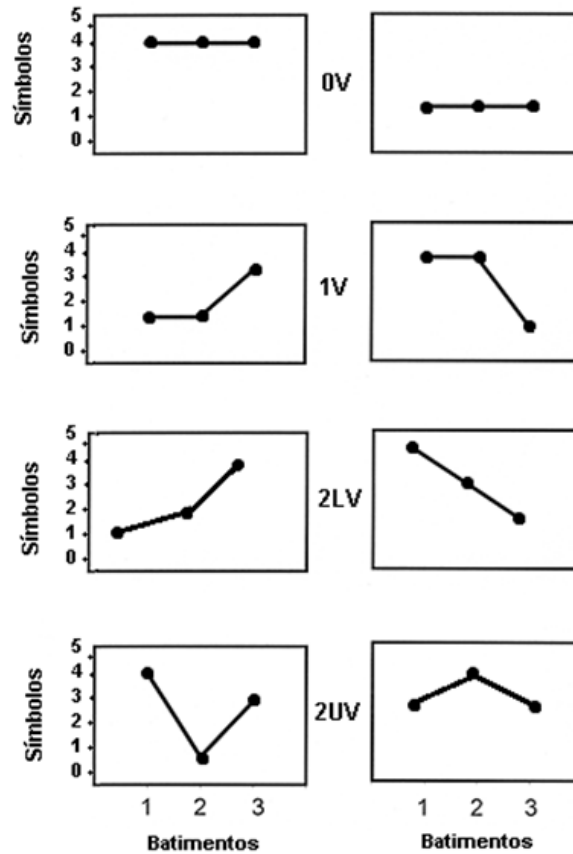


Figura 19 - Ilustração do método de análise simbólica. A série RR uniformemente distribuída em 6 níveis (de 0 a 5); cada nível foi identificado pelo símbolo (número), e os padrões de comprimento de 3 símbolos foram construídos.



PORTA, IEEE Trans Biomed Eng. 2001 (adaptado)

Figura 20 - Classificação de padrões. 0V indica padrões sem variação; 1V, padrões com 1 variação; e 2V, padrões com 2 variações.

Os índices de VFC obtidos por métodos lineares e não-lineares permitem uma utilização diversificada, firmando-se como preditor das funções internas do organismo, tanto em condições normais quanto patológicas. Com isso, atualmente esses índices tem sido utilizados para compreensão de diversas condições como: hipertensão arterial, morte súbita, insuficiência renal, insuficiência cardíaca, apnéia obstrutiva do sono, epilepsia, entre outras.