



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

**AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E
ELETROENCEFALOGRÁFICAS APÓS CRISES EPILÉPTICAS
INDUZIDAS PELO ABRASAMENTO ELÉTRICO DA AMÍGDALA EM
DIFERENTES FASES DO CICLO SONO-VIGÍLIA DE RATOS**

POLIANA PERES GHAZALE

GOIÂNIA-GO

2016



**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: Poliana Peres Ghazale

Título do trabalho: Avaliação das respostas cardiovasculares e eletroencefalográficas após crises epilêpticas induzidas pelo abramamento elétrico da amígdala em diferentes fases do ciclo sono-vigília de ratos.

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:

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 26/03/2019

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.

POLIANA PERES GHAZALE

**AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E
ELETROENCEFALOGRÁFICAS APÓS CRISES EPILÉPTICAS
INDUZIDAS PELO ABRASAMENTO ELÉTRICO DA AMÍGDALA EM
DIFERENTES FASES DO CICLO SONO-VIGÍLIA DE RATOS**

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

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Diego Basile Colugnati
Co-orientador: Profa. Dra. Aline Priscila Pansani

GOIÂNIA-GO

2016

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

Ghazale, Poliana Peres

Avaliação das respostas cardiovasculares e eletroencefalográficas após crises epiléticas induzidas pelo abasamento elétrico da amígdala em diferentes fases do ciclo sono-vigília de ratos.

[manuscrito] / Poliana Peres Ghazale, Diego Basile Colugnati, Aline Priscila Pansani. - 2016.

xxvi, 82 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Diego Basile Colugnati; co-orientador Dr. Aline Priscila Pansani.

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

Bibliografia.

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

1. Epilepsia. 2. SUDEP. 3. Abasamento. 4. Sono. 5. Sistema cardiovascular. I. Colugnati, Diego Basile. II. Pansani, Aline Priscila. III. Colugnati, Diego Basile, orient. IV. Pansani, Aline Priscila, co orient. V. Título.

CDU 612



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

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 5

1
 2 Aos vinte e um dias do mês de setembro do ano de dois mil e dezesseis, às
 3 catorze horas, no Anfiteatro do ICB2 da Universidade Federal de Goiás,
 4 reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Diego Basile
 5 Colugnati, Profa. Dra. Graziela Torres Blanch, Prof. Dr. André Henrique Freiria-
 6 Oliveira e Aline Priscila Pansani para, em sessão pública presidida pelo
 7 primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação
 8 intitulada "Avaliação das Respostas Cardiovasculares e Eletroencefalográficas
 9 após Crises Epilépticas Induzidas pelo Abrasamento Elétrico da Amígdala em
 10 Diferentes Fases do Ciclo Sono-Vigília de Ratos", em nível de mestrado, de
 11 autoria de **Poliana Peres Ghazale**, 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 36 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 nº1129 de maio de 2012 do Conselho de Ensino,
 20 Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa
 21 Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, a dissertação foi
 22 APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este
 23 requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas
 24 pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da
 25 entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as
 26 devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a
 27 contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta,
 28 às 16 horas e 40 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

29 constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da
30 Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Ciências Biológicas da
31 Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que após lida e aprovada,
32 será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual
33 teor.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Diego Basile Colugnati', written over a horizontal line.

34
35
36
37 **Prof. Dr. Diego Basile Colugnati**
38 **Presidente da Banca**
39 **Universidade Federal de Goiás**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Graziela Torres Blanch', written over a horizontal line.

40
41
42
43 **Profa. Dra. Graziela Torres Blanch**
44 **Pontifícia Universidade Católica de Goiás**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'André Henrique Freiria-Oliveira', written over a horizontal line.

45
46
47
48 **Prof. Dr. André Henrique Freiria-Oliveira**
49 **Universidade Federal de Goiás**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Aline Priscila Pansani', written over a horizontal line.

50
51
52
53 **Profa. Dra. Aline Priscila Pansani**
Universidade Federal de Goiás

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Irisman e lesser, e minha avó, Labibi.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que em nenhum momento permitiu que eu desistisse de meus sonhos ou que deixasse de lutar pelos meus ideais. Que colocou as pessoas certas em minha vida e me colocou na família certa.

Aos meus pais, Irisman e lesser, a quem devo tudo o que consegui até aqui e tudo o que ainda vou conseguir, por serem minha base e minha referência como ser humano e por terem caminhado junto comigo em cada conquista ou obstáculo. Ao meu irmão, lesser Junior, de quem me orgulho muito como ser humano, pelo companheirismo de sempre. À minha avó, Labibi, que sem dúvidas foi uma das pessoas que mais torceram pela minha vitória, nos bastidores de cada passo que dei.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Diego Colugnati, presente em minha vida acadêmica desde a Iniciação Científica, profissional em quem me espelho e de quem tenho muito orgulho de ser orientanda, pela atenção, respeito e amizade que mantém com seus alunos.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Aline Pansani, extremamente importante para a realização deste trabalho, por quem tenho uma intensa admiração e respeito pela forma como dirige seus estudos e por estar sempre presente de forma positiva nas adversidades.

Ao Prof. Dr. Fúlvio Scorza, por ter cedido seu laboratório na Universidade Federal de São Paulo para a realização de parte dos experimentos deste trabalho, por quem tenho muito respeito pelos estudos que tem feito em busca do bem-estar de pacientes com epilepsia.

Ao Prof. Dr. Guus Schoorlemmer, do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Paulo, por todo o apoio prático que forneceu ao nosso estudo, sempre de maneira gentil.

Aos Profs. Dr. Carlos Henrique Castro, Dra. Elizabeth Mendes e Dr. Carlos Henrique Xavier, por terem colaborado para o andamento deste trabalho.

À minha amiga Karina Gomes, que não só auxiliou em experimentos deste trabalho como também sempre esteve presente nos momentos bons e ruins nos últimos anos de minha vida, da mesma forma que as amigas Aryanne Melo e Fernanda Dias, verdadeiras parceiras de vida.

Aos colegas do Laboratório Integrado de Fisiologia Cardiovascular e Neurofisiologia, pela companhia e apoio de sempre, em especial ao colega Allancer Nunes, pelo apoio em experimentos realizados neste trabalho.

Aos colegas de grupo, Paula, Beatriz e Pedro Paulo, que sempre estiveram prontos para ajudar em qualquer circunstância. Aos alunos da Disciplina de Neurociência da Universidade Federal de São Paulo, Mariana, Laís, Leandro, Márcia, Nancy e Selvin, que me deram apoio e foram muito solícitos durante o período que passei no laboratório e souberam me receber de braços abertos, criando entre nós um vínculo de amizade.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus.”

(Galileu Galilei)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	x
AGRADECIMENTOS	xi

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xxii
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT	xxv
1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Epilepsia	22
1.2 Morte súbita e inesperada nas epilepsias	24
1.3 Modelo do abrasamento elétrico da amígdala para indução de epilepsia.....	27
1.4 Epilepsia e Sono	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Animais	32
3.2 Grupos Experimentais.....	32
3.3 Cirurgia para implante de eletrodos	33
3.4 Registro.....	34
3.5 Detecção das fases do ciclo sono-vigília	35
3.6 Indução das crises epiléticas	35
3.7 Variabilidade da Frequência Cardíaca	37
3.8 Função cardíaca e susceptibilidade a arritmias <i>ex vivo</i>	37
4 RESULTADOS	43
4.1 Abrasamento elétrico da amígdala.....	45
4.2 Arritmias	46
4.3 Parâmetros cardíacos <i>in vivo</i>	48
4.4 Relação entre a PGES e a FC	55
4.5 Parâmetros cardiovasculares <i>ex vivo</i>	57
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO.....	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

0V – *No variation* (Nenhuma variação)

1V – *One variation* (Uma variação)

2LV – *Two like variations* (Duas variações parecidas)

2UV – *Two unlike variations* (Duas variações diferentes)

ANOVA – Análise de variância
ABL – Amígdala basolateral
Ach – Acetilcolina
AOS – Apneia obstrutiva do sono
BAV – Bloqueio átrio-ventricular
BS – Bloqueio sinusal
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
CVP – Complexo ventricular prematuro
DAE – Drogas anti-epilépticas
E1 – Estágio 1 da escala de Racine
E2 – Estágio 2 da escala de Racine
E3 – Estágio 3 da escala de Racine
E4 – Estágio 4 da escala de Racine
E5 – Estágio 5 da escala de Racine
ECG - Eletrocardiograma
EEG – Eletroencefalograma
EEGa – Eletroencefalograma da amígdala
EEGc – Eletroencefalograma cortical
ELF – Epilepsia do lobo frontal
ELFN – Epilepsia do lobo frontal noturna
ELT – Epilepsia do lobo temporal
ELTm – Epilepsia do lobo temporal mesial
ELTn – Epilepsia do lobo temporal neocortical
EMG – Eletromiograma
EOG – Eletro-oculograma
EPM – Erro padrão da média
ES – Extra-sístole
FC – Frequência cardíaca
FCI – Frequência cardíaca intrínseca
FEN – Fenilefrina
HF – *High frequency* (Alta frequência)

KCl – Cloreto de potássio

LF – *Low frequency* (Baixa frequência)

MES – *Maximal eletroshock* (Máximo eletrochoque)

NPS – Nitroprussiato de sódio

NREM – *Non-rapid eyes moviment* (Movimento rápido dos olhos)

PD – Pós-descarga

PGES – *Postictal generalized electroencephalogram supression* (Supressão do eletroencefalograma pós crise generalizada)

PIS – Pressão intraventricular sistólica

PID – Pressão intraventricular diastólica

PIDE – Pressão intraventricular desenvolvida

dP/dt + – Derivada da pressão/Derivada do tempo durante a sístole

dP/dt - - Derivada da pressão/Derivada do tempo durante a diástole

SDNN – *Stardard deviation of the average normal RR*

R-R – Intervalo cardíaco

REM – *Rapid eyes moviment* (Movimento não rápido dos olhos)

RMSSD – *Root mean square of successive diiferences*

SNC – Sistema nervoso central

SUDEP – *Sudden Unexpected Death in Epilepsy* (Morte súbita e inesperada nas epilepsias)

VFC – Variabilidade da frequência cardíaca

WAR – *Wistar audiogenic rats* (Ratos Wistar audiogênicos)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Padrão eletroencefalográfico (EEG) e eletromiográfico (EMG), em rato, que diferenciam o estado de Vigília, sono NREM e sono REM. Nota-se, em vigília, há um ritmo theta desregulado e uma alta atividade muscular. Em NREM, observa-se ritmo delta (ondas lentas) acompanhado de uma diminuição significativa do tônus muscular. Em REM, prevalência de ritmo theta regular e quase completa atonia muscular (Adaptado de Louis et al, 2004) (62). 29

- Figura 2** - Sistema para captação de sinais biológicos e estimulação elétrica da amígdala. Os animais foram mantidos em uma gaiola transparente com livre acesso a água e alimento. Biopotenciais captados por eletrodos distribuídos nos animais foram amplificados e, através do sistema de aquisição de dados PowerLab v.8, foram lidos em forma de gráficos. Um chaveador acoplado ao sistema permitiu ora indução de estímulos, ora amplificação de sinal eletroencefalográfico da amígdala, permitindo que o sistema de aquisição de dados fosse capaz de realizar ambas as funções. 34
- Figura 3** - Figura esquemática do protocolo de deflagração diária de estímulos elétricos na região basolateral da amígdala direita. 36
- Figura 4** - Esquema de montagem de Sistema de Langendorff para experimento de coração isolado. (Fonte: adaptado de Chorro; Such-Belenguer; López-Merino, 2009) (78). 38
- Figura 5** - Figura esquemática do protocolo para análise de função cardíaca através da técnica de Langendorff para corações isolados. 39
- Figura 6** - Esquema de montagem de uma cuba de banho de órgãos utilizada para experimento de reatividade vascular. (Fonte: adaptado de YLDIZ; SEYREK; GUL. 1999) (80). 41
- Figura 7** - Esquema representativo do protocolo de vaso isolado para testes de capacidade de contração e relaxamento aórtico após teste de endotélio. FEN: Fenilefrina; Ach: Acetilcolina; NPS: Nitroprussiato de Sódio; KCl: Cloreto de Potássio. 41
- Figura 8** - Esquema representativo da ordem cronológica na qual todo o protocolo experimental foi feito, em cada animal. 42
- Figura 9** - Traçado eletroencefalográfico cortical e eletromiográfico característicos de estado de vigília. EMG Power indica a amplitude do EMG, enquanto que o NREM Power e REM Power indicam as razões entre ondas do EEG $(\delta \times \alpha)/(\beta \times \gamma)$ e $\Theta^2/(\delta \times \alpha)$, respectivamente. A faixa cinza representa o limiar. 44
- Figura 10** - Traçado eletroencefalográfico cortical e eletromiográfico característicos de estado sono NREM. EMG Power indica a amplitude do EMG, enquanto que o NREM Power e REM Power indicam as razões entre ondas do EEG $(\delta \times \alpha)/(\beta \times \gamma)$ e $\Theta^2/(\delta \times \alpha)$, respectivamente. A faixa cinza representa o limiar. 44

- Figura 11** - Traçado eletroencefalográfico cortical e eletromiográfico característicos de estado sono NREM. EMG Power indica a amplitude do EMG, enquanto que o NREM Power e REM Power indicam as razões entre ondas do EEG ($\delta \times \alpha$)/($\beta \times \gamma$) e $\Theta^2/(\delta \times \alpha)$, respectivamente. A faixa cinza representa o limiar..... 45
- Figura 12** - Tempo em que os animais permaneceram em cada estágio de Racine e tempo total necessário para abrasamento elétrico da amígdala. Resultados expressos em média \pm EPM. * NREM ou REM x Vigília. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. $p < 0,05$, $n = 5$ 46
- Figura 13** – Duração da pós-descarga em cada estágio do abrasamento feito em diferentes fases do ciclo sono-vigília. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. $p < 0,05$, $n = 5$ 46
- Figura 14** – Exemplo de extra-sístole bigeminada (A) e em salva (B), encontradas nos registros de ECG dos animais dos grupos NREM e REM..... 47
- Figura 15** – Análise da FC comparando-se os grupos antes (pré) e após (pós) o abrasamento elétrico da amígdala. Resultados expressos em média \pm EPM, $n = 5$. Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey..... 48
- Figura 16** – Análise da VFC no domínio do tempo comparando-se os grupos antes (pré) e após (pós) o abrasamento elétrico da amígdala. (A) SDNN; (B) RMSSD. Resultados expressos em média \pm EPM, $n = 4$. Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey..... 48
- Figura 17** – Análise da VFC no domínio da frequência comparando-se os grupos antes (pré) e após (pós) o abrasamento elétrico da amígdala. (A) LF (ms^2); (B) LF (nu); (C) HF (ms^2); (D) HF (nu); LF/HF. Resultados expressos em média \pm EPM, $n = 4$. Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. 49
- Figura 18** - Análise simbólica da VFC comparando-se os grupos antes (pré) e após (pós) o abrasamento elétrico da amígdala. (A) 0V (%); (B) 1V (%); (C) 2LV (%); (D) 2UV (%). Resultados expressos em média \pm EPM, $n = 4$. Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. 50
- Figura 19** – FC basal e pós-ictal dos grupos abrasados em Vigília, NREM e REM em todos os estágios da escala de Racine. (A) Estágio 1; (B) Estágio 2; (C) Estágio 3; (D) Estágio 4; (E) Estágio 5. Resultados expressos em média \pm EPM. *Pós-ictal x Basal.

- REM x Vigília. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, $n = 5$.
..... 51
- Figura 20** – FC instantânea mínima e máxima atingidas durante o período ictal em todos os estágios da escala de Racine. (A) Estágio 1; (B) Estágio 2; (C) Estágio 3; (D) Estágio 4; (E) Estágio 5. Resultados expressos em média \pm EPM. ● NREM ou REM x Vigília; * FC máxima ou FC mínima x Pré-ictal. # FC máxima x FC mínima. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, $n = 4$ 53
- Figura 21** – Porcentagem de bradicardia (A) e de taquicardia (B), em E5, no período ictal comparado com o período pré-ictal. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $n = 4$ 54
- Figura 22** – Tempo de latência para FC instantânea mínima (A) e máxima (B) durante o período ictal nos estágios 4 e 5 da escala de Racine. Resultados expressos em média \pm EPM. * REM x NREM. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, $n = 4$ 54
- Figura 23** – Figura representativa da variação da FC ictal e pós-ictal em comparação com a média da FC pré-ictal, desde 30 segundos antes do estímulo elétrico até 60 segundos após o término da crise (E5). (A) Grupo Vigília; (B) Grupo NREM; (C) Grupo REM. Cada ponto indica a média de cada segundo durante todo o tempo da análise. A linha pontilhada vertical preta indica o momento do estímulo e a vermelha indica a média da duração da pós-descarga. 54
- Figura 24** – Registro de EEGa, EEGc, ECG e de FC de um animal do grupo Vigília, demonstrando a bradicardia seguida pela taquicardia que ocorrem no período ictal que ocorrem de maneira similar em todos os grupos. A seta preta aponta para o momento da bradicardia e a vermelha para a taquicardia rebote. 55
- Figura 25** – Duração da supressão pós-ictal do EEG nos estágios 4 e 5 da escala de Racine. Resultados expressos em média \pm EPM. * REM x Vigília. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, $n = 4$ 55
- Figura 26** – Registro de EEGc de animal estimulado em estado de Vigília (A) e de sono REM (B) em E4. Em ambos os registros, entre as duas primeiras linhas verticais tracejadas está o período de pós-descarga e entre a segunda e terceira linha o período de PGES. 56

Figura 27 – Análise da FC nos períodos pré-ictal, ictal, durante e após a supressão pós-ictal do EEG em crises E5. Resultados expressos em média \pm EPM. • diferente em relação ao grupo Vigília; * diferente em relação ao período pré-ictal; # diferente em relação ao período ictal. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, $n = 5$ 57

Figura 28 – Registro de EEGc (A), ECG (B) e FC (C) de animal estimulado em estado de Vigília em estágio E5. A seta preta aponta para o momento do estímulo elétrico, a vermelha para o fim da pós-descarga, a azul para o fim da PGES, a verde para a bradicardia ictal e a amarela para a taquicardia ictal. Nota-se uma diminuição da FC no período de PGES (entre as setas vermelha e azul). 57

Figura 29 – Análise da FCI (A), PAS (B), $dP/dt+$ (C), $dP/dt-$ (D) e PIDE (E) antes da oclusão da artéria coronária (valores que antecedem a primeira linha vertical pontilhada), durante a isquemia (valores entre as duas linhas verticais pontilhadas) e no período de reperfusão coronariana (após segunda linha vertical pontilhada) de corações isolados de ratos dos grupos Sham, Vigília, NREM e REM (Sham $n = 5$, Vigília $n = 3$, NREM $n = 2$, REM $n = 2$). 58

Figura 30 – Análise da porcentagem de contração induzidos por administração de concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina em anéis de aorta com (A) e sem (B) endotélio. Resultados expressos em média \pm EPM. * NREM x REM; + NREM x Vigília; # REM x Vigília; & REM x Sham. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Sidak, $p < 0,05$, $n = 3$ 59

Figura 31 – Análise da porcentagem de contração induzida por KCl 120 mM em anéis de aorta com (A) e sem (B) endotélio. Resultados expressos em média \pm EPM. * Vigília x Sham. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, $n = 3$ 60

Figura 32 – Análise da porcentagem de relaxamento induzidos por administração de concentrações crescentes e cumulativas de Ach, em anéis de aorta com endotélio (A), e de NPS (B). Resultados expressos em média \pm EPM. * REM x Sham, Vigília e NREM; # Sham x Vigília, NREM e REM. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Sidak, $p < 0,05$, $n = 3$ 60

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Distribuição das arritmias encontradas antes, durante e após crises (E5) induzidas em diferentes fases do ciclo sono-vigília..... 47
- Tabela 2** - Distribuição de extra-sístoles bigeminadas ou em salva encontradas entre crises e após crises (E5) induzidas em diferentes fases do ciclo sono-vigília.. 47
- Tabela 3** – Resultados da FC basal e pós-ictal dos animais abrasados em Vigília, NREM e REM em todos os estágios da escala de Racine..... 52

RESUMO

Introdução: Alterações cardiovasculares têm sido apontadas como principal causa de Morte Súbita e Inesperada em Epilepsia (SUDEP). Existe uma íntima relação entre a epilepsia e o sono. A maioria dos casos de SUDEP ocorre durante o sono e há indícios de que o sono NREM é facilitador para ocorrência de crises. **Objetivo:** Avaliar respostas cardiovasculares e eletroencefálicas de ratos submetidos ao modelo de abrasamento induzido em diferentes fases do ciclo sono-vigília. **Métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (CEUA-035/2015). Foram utilizados ratos Wistar (250-350 g), que foram separados em grupos nos quais a epileptogênese foi induzida em diferentes fases do ciclo sono-vigília (Vigília, NREM e REM). Utilizou-se o modelo Kindling para indução de crises. Para isso, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de eletrodos na amígdala direita, para indução de estímulos elétricos, e no córtex, para registro eletroencefalográfico (EEGc). Eletrodos para registro de eletromiograma (EMG) e eletrocardiograma (ECG) também foram implantados. Para detecção da fase do sono utilizou-se algoritmos que se baseiam no EEGc e no EMG. O estímulo elétrico foi induzido uma vez por dia e consistia em onda bifásica, a 60 Hz durante 2 segundos. A progressão das crises foi analisada de acordo com a escala

de Racine (1972) (E1: movimentos orofaciais; E2: movimentos mastigatórios e clonia da cabeça; E3: contração dos membros anteriores; E4: elevação corporal; E5: crise convulsiva com perda do controle postural). Foram induzidas, então, 3 crises E5 em cada animal. Avaliou-se Frequência Cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC), arritmias e EEGc *in vivo*, além de função cardíaca e reatividade vascular *ex vivo*. **Resultados:** O tempo para abrasamento elétrico da amígdala do grupo NREM é menor quando comparado com o grupo Vigília. O grupo NREM apresenta taquicardia pós-ictal ainda nos primeiros estágios do abrasamento. A duração de supressão do eletroencefalograma pós crise generalizada (PGES), é maior no grupo REM. A PGES, no grupo Vigília, vem acompanhada de uma diminuição na FC quando comparada com o período final das crises. O grupo Vigília tem maior capacidade de contração que os demais grupos, independentemente de endotélio enquanto que o grupo REM possui maior porcentagem de relaxamento, dependente de endotélio. Parâmetros como duração de pós-descarga (PD), FC e VFC após o abrasamento, arritmias, a bradicardia seguida de taquicardia durante o período ictal de crises E5 e a função cardíaca *ex vivo* foram similares em todos os grupos experimentais. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que apenas o abrasamento elétrico da amígdala é suficiente para induzir aumento na FC pós-ictal do grupo NREM, aumento na duração da PGES no grupo REM, e alterações na reatividade vascular dos grupos NREM e REM, tendo o primeiro uma maior porcentagem de contração e o segundo, maior porcentagem de relaxamento quando comparado com os demais grupos.

Palavras-chave: Epilepsia; SUDEP; abrasamento; Sono; Sistema cardiovascular.

ABSTRACT

Introduction: Cardiovascular alterations have been identified as the main cause of Sudden Unexpected Death in Epilepsy (SUDEP). There is an intimate relationship between epilepsy and sleep. Most cases of SUDEP occurs during sleep and the NREM sleep is a facilitator factor for the occurrence of seizures. **Aim:** To evaluate cardiovascular and electroencephalographic responses of rats submitted to kindling model induced at different stages of sleep-wake cycle. **Methods:** The experimental protocol was approved by Ethics Committee of the Universidade Federal de Goiás (CEUA-035/2015). Wistar rats (250-350 g) were separated into 4 groups and seizures were induced according to sleep-wake cycle (Wake, NREM sleep and REM sleep) or no seizure (SHAM). We used the kindling model for induction of seizures. The animals were submitted to stereotactic surgery to implant electrodes in the right amygdala, for electrical stimulation, and in the cortex, for electroencephalographic record (EEGc). Electrodes for electromyographic (EMG) and electrocardiographic (ECG) recordings were also implanted. The detection of sleep phase was based on algorithms described by Louis et al. (2003). The electrical stimulus was induced one time per day and consisted in a biphasic wave during 2 seconds (60 Hz). The seizures evolution was analyzed according to Racine's scale (E1: orofacial movements; E2: masticatory movements and head clonus; E3: forelimb clonus; E4: rearing; E5: rearing and falling). Three E5 seizures were induced in each animal. We evaluated heart rate (HR), heart rate variability (HRV) arrhythmias and EEGc *in vivo*, cardiac function and vascular reactivity *ex vivo*. **Results:** The time fully kindling in NREM group was lower compared to Wake group. The NREM group presents postictal tachycardia in the early stages of process. The duration of postictal generalized electroencephalogram

suppression (PGES) is larger in REM group. The PGES in Wake group was accompanied by a decrease in HR compared to the final period of seizures. The muscle cell in aortic artery of Wake group had greater contraction capacity than the other groups, while the REM group had a higher endothelium-dependent relaxation. Parameters such as after-discharge duration (AD), HR and HRV after kindling process, arrhythmias, bradycardia followed by tachycardia during the ictal period of E5 seizures and *ex vivo* cardiac function were similar in all groups. **Conclusion:** Our results suggest that kindling process *per se* was able to induce an increase in post-ictal HR in NREM group, an increase in PGES duration in REM group, and an impairment on vascular reactivity of NREM (higher contraction percentage) and REM (lower relaxation percentage) groups.

Keywords: Epilepsy; SUDEP; kindling; sleep; cardiovascular system.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

As epilepsias constituem um conjunto de doenças cerebrais, caracterizadas pela ocorrência de duas crises convulsivas em um intervalo de tempo maior que 24 horas, ou por apenas uma, quando o risco de recorrência for superior a 60% (1). O risco de recorrência de crises epiléticas é medido a partir de uma série de exames neurológicos realizados após a primeira crise, demonstrando alterações que podem predispor o indivíduo a outra, como traçado eletroencefalográfico característico epileptiforme (1).

As crises convulsivas, por sua vez, ocorrem devido a uma hiperatividade cerebral, com descargas paroxísticas, que podem acontecer em uma determinada região cerebral, se espalhando ou não para ambos os hemisférios. A hiperatividade cerebral é reflexo da falta de equilíbrio entre os mecanismos de excitação, promovidos principalmente pela liberação de glutamato, e inibição neuronal, promovidos pela liberação de GABA na maioria das sinapses inibitórias do sistema nervoso central (SNC) (2,3). Em pacientes com epilepsia há notável perda de neurônios GABAérgicos (2,4). Uma vez danificados, uma reorganização sináptica se faz necessária, de maneira que o brotamento de fibras musgosas em sítios sinápticos anteriormente danificados causa uma hiperexcitabilidade neuronal devido ao surgimento de potenciais pós-sinápticos excitatórios em detrimento dos inibitórios, levando a epileptogênese (5–8).

Do ponto de vista epidemiológico, as epilepsias constituem, hoje, uma das doenças neurológicas graves mais comuns (9). Na América Latina, a média de prevalência da doença é de 17,8/1.000 pessoas, e a incidência varia de 77,7-190/100.000/ano pessoas (10).

De acordo com o foco epilético, as crises epiléticas podem ser classificadas em focais ou generalizadas. As crises focais são originadas em redes neuronais presentes em apenas um hemisfério cerebral (11). Estas são ainda subdivididas em crises de manifestação motora e não motora. As motoras podem ser tônicas (extrema contração muscular sustentada), clônicas

(movimentos repetitivos de contração e relaxamento muscular), mioclônicas (contrações involuntárias súbitas e de curta duração), atônicas (diminuição ou perda total súbita do tônus muscular), espasmos epilépticos (flexão e/ou extensão súbita muscular, de maior duração que as mioclônicas) ou hipermotoras (chutes, palmas, fricção das mãos, automatismos, entre outros). As não motoras podem se apresentar de forma sensorial (alto nível de percepção sensorial sem estímulo externo), cognitiva (perda de controle da linguagem ou percepção espacial), emocional (experiência de grandes emoções, como choro ou risos sem estímulos externos, por exemplo) ou autonômica (disfunção do sistema nervoso autônomo) (12).

As crises generalizadas têm foco epiléptico em ambos os hemisférios cerebrais de forma simultânea, acometendo estruturas corticais ou subcorticais, não necessariamente de forma simétrica (11). Elas, assim como as crises focais, podem se apresentar de forma clônica, tônica, atônica, tônico-clônica, mioclônica e em espasmos epilépticos (crises motoras). Há também, dentro das crises generalizadas, a chamada crise de ausência. Nesse caso ocorre uma interrupção das atividades normais de forma brusca e inesperada, com olhar desfocado e interrupção da fala. Uma crise pode ainda ter início em um foco epiléptico restrito a um hemisfério cerebral e, em seguida, se generalizar para ambos os hemisférios, condição denominada de crises secundariamente generalizadas (12,13).

As epilepsias podem ser classificadas de acordo com o foco epiléptico, com o tipo de crise ou pela etiologia da doença. De acordo com a etiologia, as epilepsias podem ser classificadas em estruturais, metabólicas, infecciosas ou mesmo ter causa desconhecida (11,14,15). Além desses, alterações genéticas, como mutações em genes que codificam determinadas proteínas, também podem causar epilepsia (8,14). Sabe-se, por exemplo, que alterações nos genes que codificam alguns canais para K^+ , como os canais do tipo v1.1, v7 e v8, podem culminar em determinados tipos de epilepsia, já que este íon é essencial para a excitabilidade celular (8,16). As epilepsias estruturais podem ser visíveis em exames de neuroimagem e referem-se a alterações em determinadas estruturas cerebrais que levam a crises epilépticas, como por exemplo epilepsias do lobo frontal ou occipital (17).

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) constitui a forma mais prevalente da doença (18,19). Ela pode ser classificada em ELT mesial (ELTm), na qual as crises têm foco hipocampal ou parahipocampal, correspondendo à maioria dos casos, e ELT neocortical (ELTn), quando o foco epiléptico está no neocortex do lobo temporal lateral (20,21). A ELTm está associada a uma condição denominada “esclerose hipocampal”. Trata-se de uma atrofia do hipocampo dos pacientes, observada em exames de imagem, que se deve à grande perda celular que ocorre na região CA1 e no Hilo do hipocampo. Além disso, ocorre uma dispersão de células granulares no giro denteado dos mesmos, motivo pelo qual essa região se torna mais espessa (5,22).

Considerando-se a fisiopatologia da epilepsia, muitas drogas anti-epilépticas (DAE) têm sido criadas a fim de minimizar os efeitos causados pela hiperexcitabilidade neuronal, ora exacerbando os processos inibitórios (Fentobarbital e Benzodiazepínicos), ora atenuando os excitatórios (Carbamazepina e Lamotrigina) (23). Bloqueadores da recaptação de GABA, inibidores da enzima GABA-transaminase, potencializadores e agonistas GABAérgicos, além de ativadores de canais para Cl^- podem ser usados para aumentar a capacidade inibitória de neurônios. Por outro lado, bloqueadores de canais para Ca^{++} e para Na^+ e antagonistas glutamatérgicos dificultam a atividade excitatória. Embora muitos estudos estejam voltados para a criação ou aperfeiçoamento de drogas anti-epilépticas (DAE), o índice de refratariedade ao tratamento farmacológico é alto na ELT, principalmente quando se trata de monoterapias, desta forma, opta-se pelo regime de politerapia. No entanto, uma parcela dos pacientes continuará refratária, mesmo neste regime. (22,23).

1.2 Morte súbita e inesperada nas epilepsias

O índice de mortalidade dos pacientes com epilepsia é maior quando comparado com o da população em geral (25,26). Isso ocorre, principalmente, por uma condição denominada de “Morte Súbita e Inesperada em Epilepsia” (SUDEP, do inglês *Sudden Unexpected Death in Epilepsy*), que é a principal causa de morte, diretamente relacionada com a epilepsia (27). A SUDEP é definida como uma morte súbita, não traumática, sem evidências de afogamento e sendo ou não precedida por uma crise convulsiva em pacientes com epilepsia,

excluindo-se a condição de *status epilepticus*, sem evidência clara de alterações patológicas e estruturais (28). A causa da SUDEP vem sendo alvo de muitos estudos científicos. Muitos deles relacionam a condição com alterações cardiovasculares, respiratórias e encefálicas que podem ocorrer tanto no período interictal, isto é, entre uma crise epiléptica e outra, quanto no período peri-ictal (período que abrange o momento logo antes da crise, a crise e logo após a mesma) (29–32). Os principais fatores de risco para SUDEP estão relacionados com o tempo da doença, politerapia, refratariedade farmacológica, epilepsias de causa idiopática, temperaturas frias e alta frequência de crises tônico-clônicas não tratadas (33).

Do ponto de vista cardiovascular, o principal fenômeno proposto como causa da SUDEP é a presença de arritmias (30). Ocorre que a hiperatividade neuronal durante a crise pode atingir centros hipotalâmicos responsáveis pela regulação cardiovascular, podendo levar não só à arritmias (bloqueios de condução, fibrilação ventricular, entre outros) como também à alterações na frequência cardíaca (FC) e na modulação autonômica de pacientes com epilepsia (29,30). Estudos tanto clínicos quanto experimentais têm demonstrado certos padrões de FC alterados em pacientes com epilepsia. Nota-se, no período ictal, casos de taquicardia decorrentes de um aumento da modulação simpática (34–36). Observou-se, somado a isso, uma bradicardia que precede a condição de taquicardia ictal cuja intensidade está relacionado com o aumento no número de crises (37). Além disso, a FC de repouso está aumentada em indivíduos com epilepsia (38).

Tais alterações sugerem que a modulação autonômica cardíaca está alterada tanto em pacientes quanto em animais submetidos a diversos modelos de epilepsia crônica, o que parece se confirmar numa série de estudos que avaliam a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) dos mesmos. De fato, a análise da VFC é o principal método não-invasivo utilizado para avaliação da modulação autonômica, uma vez que a atividade simpática ou parassimpática resulta em flutuações dos intervalos cardíacos (39,40). A avaliação da VFC pode ser feita de diferentes maneiras: no domínio do tempo e no domínio da frequência.

No domínio do tempo, podemos avaliar a modulação autonômica observando-se o desvio-padrão da média dos intervalos RR (SDNN, do inglês Standard deviation of the average normal RR) e pela raiz quadrada da média de sucessivos intervalos RR (RMSSD, do inglês Root mean square of successive differences) (39,41). O SDNN reflete alterações tanto da modulação simpática quanto parassimpática, e ainda pelo ciclo circadiano (42) ao passo que a RMSSD é influenciada basicamente pela modulação parassimpática (41). Por outro lado, através das análises no domínio da frequência, é possível determinar o quanto que cada componente (simpático, parassimpático e ciclo circadiano) contribui para a potência total de uma série temporal. A análise no domínio do tempo gera um espectro de frequência que normalmente é dividido em três componentes principais: alta (HF, *High Frequency*), baixa (LF, *Low frequency*) e muito baixa frequência (VLF, *Very low frequency*), onde HF reflete modulação vagal dos parâmetros cardiovasculares, LF modulação simpática e VLF principalmente o papel de determinados hormônios, receptores e peptídeos nessa modulação (40,42). Há, ainda, uma outra maneira de se analisar a VFC, em forma de transformações simbólicas, onde 0V indica que não há nenhuma variação entre sucessivos símbolos (traduzindo modulação simpática), 1V significa uma variação (modulação tanto simpática quanto parassimpática), 2LV (*Two like variations*) significa que há duas variações entre os símbolos e que elas são parecidas, isto é, no mesmo sentido e 2UV (*Two unlike variations*) indica que há duas variações e que elas são em sentidos diferentes (os dois últimos refletem modulação vagal). Esse método ainda é novo, mas promissor, uma vez que permite que séries temporais menores (menor tempo de registro) possam ser utilizadas (43,44).

Estudos mostram uma redução da VFC em pacientes com epilepsia (45). Essa redução reflete uma baixa capacidade de adaptação do sistema cardiovascular às alterações fisiológicas, podendo levar o indivíduo à morte (41). Há evidências de que pacientes com epilepsia tenham alterações na VFC tanto no domínio do tempo (SDNN e RMSSD) quanto no domínio da frequência (LF), (45,46). Em um estudo recente, Romigi *et al.* (47) encontraram um aumento na razão LF/HF em pacientes com ELT nos períodos pré-ictal, ictal e no pós-ictal,

além de uma exacerbação de SDNN e RMSSD no período ictal, sugerindo um aumento do tônus simpático e um desequilíbrio vagal durante a crise.

Somada às alterações cardiovasculares já mencionadas, recentemente a SUDEP vem sendo associada com um evento denominado de Supressão do Eletroencefalograma (EEG) pós Crise Generalizada (PGES, do inglês *Postictal Generalized EEG Supression*) (48,49). A PGES em humanos é caracterizada por uma supressão do EEG, de forma uni ou bilateral, compreendida como uma redução da amplitude do mesmo para menos que 10 μ V por mais de 1 segundo, que pode acontecer em até 30 segundos após o período ictal (49,50). Em 2010, Lhatoo *et al.* (49) mostraram que, comparando-se um grupo de pacientes acometidos por SUDEP com um outro que não acometido, o tempo de duração da PGES foi significativamente maior no primeiro grupo quando analisadas crises motoras, não sendo encontrada essa alteração em outros tipos de crise. Esse mesmo estudo também mostrou que quando a duração da PGES é maior que 50 segundos, aumenta-se o risco para SUDEP (49). Apesar de poucos e contraditórios estudos acerca da PGES, nota-se uma importante relação da mesma com disfunção respiratória durante o período em que ela ocorre, tornando ainda mais importante o entendimento de sua relação com a SUDEP (51,52).

1.3 Modelo do abrasamento elétrico da amígdala para indução de epilepsia

Tendo em vista a dificuldade de se realizar pesquisas acerca das epilepsias em humanos devido a limitações metodológicas e éticas, uma vez que os estudos envolvem procedimentos muitas vezes invasivos, vários modelos de experimentação animal têm sido produzidos em prol de se gerar avanços científicos nesta área (53,54). Entre modelos crônicos e agudos, encontram-se os genéticos, químicos e de abrasamento elétrico (55–58). A escolha do modelo a ser seguido em cada pesquisa depende, basicamente, do objetivo da mesma, porém os mais utilizados na atualidade são o da pilocarpina e o do abrasamento elétrico da amígdala.

Em 1967, Goddard *et al.* (57) iniciou seus estudos acerca de um modelo para indução de crises epilépticas que denominou de “Efeito Kindling” (no Brasil, traduzido como “abrasamento”), que definiu como “alterações progressivas que resultam de repetidas estimulações elétricas” (56,57). Mais tarde, Racine (59–61) aperfeiçoou o modelo, concluindo no que hoje conhecemos como “abrasamento elétrico da amígdala”, modelo que utilizamos na corrente pesquisa.

No abrasamento elétrico, sucessivos estágios comportamentais e eletroencefalográficos evoluem a partir de estímulos elétricos diários, de baixa intensidade, com intervalos de 24 horas entre si. Estes estímulos podem ser induzidos em estruturas relacionadas à ELT como hipocampo e amígdala (56,60). A evolução comportamental decorrente deste modelo foi catalogada e classificada por Racine em 1972, da seguinte maneira:

- *Estágio 1 (E1)*: Animal imóvel, pisca o olho estimulado, apresenta movimentos orofaciais e de vibrissas;
- *Estágio 2 (E2)*: Sintomas do E1, acrescido de movimentos clônicos da cabeça e mastigação;
- *Estágio 3 (E3)*: Sintomas do E2, acrescidos de clonias de membros;
- *Estágio 4 (E4)*: Sintomas do E3, acrescidos de elevação corporal, na qual o animal se mantém somente sobre os membros posteriores;
- *Estágio (E5)*: Sintomas do E4 seguida de queda. Perda total do controle da postura, caracterizadas como crises tônico-clônicas generalizadas.

O animal é considerado completamente abrasado quando três crises em estágio 5 são induzidas de forma consecutiva, o que ocorre após, em média, 15 dias de estímulo. Após esse período as crises são sustentadas na fase 5, não regredindo mais de estágio (56,60).

Este modelo é interessante partindo do princípio de que as crises são deflagradas logo após o estímulo elétrico, isso permite que o pesquisador defina o momento correto em que as crises devem ser induzidas e, além disso, com

qual frequência isso ocorrerá. Desta maneira, é possível melhor controle da avaliação de parâmetros fisiológicos no período ictal, diferente do que acontece na indução de epilepsia pela administração de pilocarpina, por exemplo.

1.4 Epilepsia e Sono

O sono é dividido em duas fases principais: movimento não rápido dos olhos (NREM, *non rapid eyes movement*) e movimento rápido dos olhos (REM, *rapid eyes movement*). Elas se diferenciam entre si de maneira comportamental e eletroencefalográfica. A primeira fase pela qual o sono passa é a NREM. Ela é caracterizada por um tônus muscular bastante diminuído quando comparado com o estado de vigília. O sono NREM é, em humanos, dividido em 3 fases (N1, N2 e N3), sendo a última delas conhecida como “Sono de Ondas Lentas”. Isso porque o traçado eletroencefalográfico dessa fase é caracterizado pela presença de ondas em ritmo delta (δ , 1,5-6 Hz) (Figura 1), que possui alta amplitude e baixa frequência. Nessa fase, o eletromiograma (EMG) encontra-se com baixa amplitude e o eletro-oculograma (EOG) pouco ativo. No sono REM, diferente do que acontece na primeira fase, há uma alta atividade neuronal, apresentando um ritmo theta (θ , 6-10 Hz) regular. Em contrapartida, há atonia muscular e movimento rápido dos olhos, evidenciado pelo EOG mais ativo. Desta forma, esta fase do sono também é chamada se sono paradoxal. No geral, seres humanos adultos passam apenas cerca de 20 % do tempo do ciclo sono-vigília em sono REM. (62–65) (Figura 1).

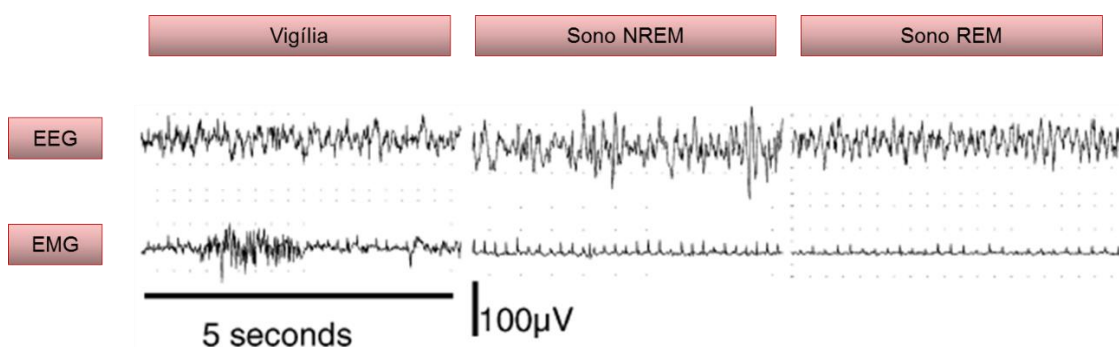


Figura 1 – Padrão eletroencefalográfico (EEG) e eletromiográfico (EMG), em rato, que diferenciam o estado de Vigília, sono NREM e sono REM. Nota-se, em vigília, há um ritmo theta desregulado e uma alta atividade muscular. Em NREM, observa-se ritmo delta (ondas lentas) acompanhado de uma diminuição significativa do tônus muscular. Em REM, prevalência de ritmo theta regular e quase completa atonia muscular (Adaptado de Louis et al, 2004) (62).

Inúmeros tem sido os estudos que associam as Epilepsias com o sono. De fato, o estágio do sono em que o paciente se encontra tem se mostrado crucial para o desenvolvimento de crises. Estudos apontam que durante o sono NREM há um alto nível de sincronização neuronal tálamo-cortical, que pode ser o motivo pelo qual essa fase tem se mostrado facilitadora do aparecimento das crises, enquanto que, por outro lado, a fase REM parece suprimi-las (66–68). Durante o sono é possível encontrar maior quantidade de descargas epileptiformes interictais, especialmente na fase NREM (69). Além disso a privação do sono pode aumentar a frequência de crises (70).

A influência da epilepsia no sono é recíproca. Um estudo demonstrou que ratos Wistar com epilepsia induzida pela pilocarpina possuem menor quantidade de tempo em vigília ativa e maior em sono NREM (71). Utilizando o modelo do abrasamento elétrico da amígdala, mostrou-se que quando crises foram induzidas durante o período claro houve uma diminuição do tempo de sono, tanto NREM quanto REM, ao passo que quando induzidas no período escuro, somente o tempo de NREM foi diminuído (72). As epilepsias podem provocar privação do sono por duas vias: diretamente, devido às crises epiléticas que ocorrem nesse período, e indiretamente, através do efeito das DAEs (73).

Nota-se, portanto, que a epilepsia e o sono são fatores que se relacionam: alterações na arquitetura do sono podem aumentar a frequência de crises, e as crises podem alterar a arquitetura do sono. Somado a todos esses fatores, torna-se importante ressaltar que cerca de 60 % dos pacientes vão a óbito por SUDEP durante o sono e que, mesmo o sono NREM sendo responsável pela facilitação das crises, quando essas ocorrem durante a fase REM o risco para SUDEP é maior (74–76). Um estudo recente de Hajek e Buchanan (77) feito em camundongos utilizando o modelo de máximo eletrochoque (MES) para indução de crises epiléticas, observou que todos os animais em que crises eram induzidas durante o sono REM morreram, ao passo que 67 % dos animais com crises durante o sono NREM e 50 % dos com crise em vigília morreram. Nesse sentido, torna-se importante um estudo que identifique qual a relação entre o sono, a epilepsia e alterações cardiovasculares e neurológicas que fazem de alterações do sono um fator de risco para SUDEP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar alterações cardiovasculares e encefálicas produzidas por crises epilépticas induzidas em diferentes fases do ciclo sono-vigília pelo modelo de abrasamento elétrico da amígdala.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel do ciclo sono-vigília no tempo para abrasamento elétrico total da amígdala, bem como na duração das crises induzidas em cada fase deste processo;

- Avaliar a FC nos períodos pré-ictal, ictal e pós-ictal de ratos com crises epilépticas induzidas em diferentes fases do ciclo sono-vigília pelo abrasamento elétrico da amígdala;

- Avaliar o efeito do abrasamento elétrico da amígdala induzido em diferentes fases do ciclo sono-vigília sobre a modulação autonômica através da análise da VFC;

- Avaliar a presença de arritmias durante as crises epilépticas induzidas em diferentes fases do ciclo sono-vigília;

- Avaliar a supressão do EEG pós crises generalizadas de animais cujas crises epilépticas foram induzidas em diferentes fases do ciclo sono-vigília;

- Avaliar o efeito do abrasamento elétrico da amígdala induzido em diferentes fases do ciclo sono-vigília na função cardíaca *ex vivo*;

- Avaliar o efeito do abrasamento elétrico da amígdala induzido em diferentes fases do ciclo sono-vigília na reatividade vascular *ex vivo*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos, da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 350 g, provenientes o Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Os animais permaneceram alojados em gaiolas apropriadas com livre acesso à água e ração. As condições do biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, do Instituto de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Goiás obedeceram a um ciclo claro-escuro de 12 horas (claro: 7:00h – 19:00h) e a temperatura foi mantida constantemente a 21 ± 1 °C.

Todos os procedimentos realizados foram submetidos e analisados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (CEUA: 035/2015).

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos, de maneira que em três deles foram induzidas crises durante cada fase o ciclo sono-vigília (Vigília, Sono NREM e Sono REM) e, em outro, nenhuma crise foi induzida (Grupo Sham). Desta forma, tempos:

3.2.1 Grupo Sham: animais submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação de eletrodo, porém não foram induzidas crises convulsivas, passaram apenas pelo procedimento de determinação do limiar da pós-descarga;

3.2.2 Grupo Epilepsia Vigília: animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implante de eletrodos bem como ao protocolo de abrasamento elétrico da amígdala, sendo todos os estímulos elétricos induzidos somente durante a vigília;

3.2.3 Grupo Epilepsia NREM: animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implante de eletrodos bem como ao protocolo de abrasamento elétrico da amígdala, sendo todos os estímulos elétricos induzidos somente durante a fase NREM do sono;

3.2.4 Epilepsia REM: animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implante de eletrodos bem como ao protocolo de abrasamento elétrico da amígdala, sendo todos os estímulos elétricos induzidos somente durante a fase REM do sono.

3.3 Cirurgia para implante de eletrodos

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implante de eletrodos para registro dos biopotenciais: eletroencefalograma (EEG), eletrocardiograma (ECG) e eletromiograma (EMG). Foi realizado tratamento com antibiótico (Pentabiótico – 100 mg/Kg, s.c.) e anti-inflamatório (Flunixin – 2 mg/Kg, s.c.) por 3 dias, a partir do dia da cirurgia, para prevenção de dor e infecção.

Os eletrodos para EEG foram implantados por meio de cirurgia estereotáxica. Um eletrodo bipolar de níquel-cromo foi implantado no complexo amigdalóide direito (coordenadas: AP -2,5 mm, ML 4,5 mm e DV -8,5 mm, em relação ao bregma). Este eletrodo foi utilizado tanto para o registro eletroencefalográfico (EEG_a), como para a estimulação elétrica no processo de abrasamento. Dois parafusos de aço inoxidável foram implantados no osso parietal esquerdo (coordenadas: AP +3 mm, ML + 1 mm, em relação ao bregma) e no osso temporal esquerdo (coordenadas: AP +4 mm, ML + 1 mm, em relação ao lâmbda). Nestes parafusos foram ancorados eletrodos monopolares de níquel-cromo. A derivação entre estes dois eletrodos foi utilizada para registro do EEG cortical (EEG_c), o qual foi utilizado para detecção das fases do sono. Todos os eletrodos foram fixados a um conector de saída e ancorados ao crânio por cimento acrílico.

Os eletrodos para ECG foram constituídos de cabos de inox (5 lb) revestidos com nylon, exceto nas extremidades. Um eletrodo foi fixado ao processo xifoide e outro inserido no mediastino, sendo fixado por um ponto de sutura ao músculo esternocleidomastóideo. O trajeto dos fios entre as duas extremidades foi feito subcutaneamente.

Os eletrodos para EMG foram constituídos de cabos de inox (5 lb) revestidos, exceto na extremidade proximal e 1,5 cm posterior à extremidade

proximal (região em contato com o músculo). Com a ajuda de uma agulha hipodérmica (21G) o fio foi conduzido de forma a transpassar o músculo trapézio (um fio do lado direito e outro do lado esquerdo), permanecendo a extremidade distal na região subcutânea do dorso do animal, de forma a somente a região desencapada estar em contato com as fibras musculares.

3.4 Registro

Amplificadores de sinal biológico foram conectados ao conector de saída ancorado no crânio dos animais para registro de EEGc, EEGa, EMG e ECG. Os sinais captados foram traduzidos em forma de registros eletrográficos e lidos por meio do sistema de aquisição de dados *PowerLab v8 (AD Instruments, Austrália)* (Figura 2).

Outros parâmetros também puderam ser calculados através dos sinais de biopotenciais, como os tipos de bandas do EEGc (δ : 1,5-6 Hz; θ : 6-10 Hz; α : 10,5-15 Hz; β : 22-30 Hz; γ : 35-45 Hz), FC e VFC a partir dos intervalos R-R do ECG.

Os animais foram registrados durante, no mínimo, uma hora por dia para registro basal/pré-ictal (30 minutos), ictal (período de pós-descarga), e pós-ictal (30 minutos).

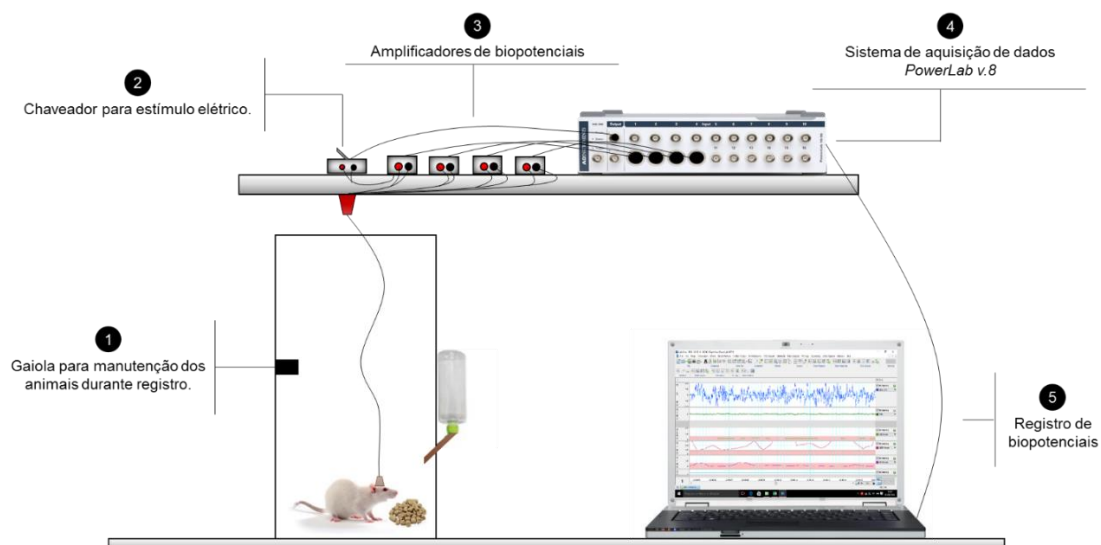


Figura 2 - Sistema para captação de sinais biológicos e estimulação elétrica da amígdala. Os animais foram mantidos em uma gaiola transparente com livre acesso a água e alimento. Biopotenciais captados por

eletrodos distribuídos nos animais foram amplificados e, através do sistema de aquisição de dados PowerLab v.8, foram lidos em forma de gráficos. Um chaveador acoplado ao sistema permitiu ora indução de estímulos, ora amplificação de sinal eletroencefalográfico da amígdala, permitindo que o sistema de aquisição de dados fosse capaz de realizar ambas as funções.

3.5 Detecção das fases do ciclo sono-vigília

Duas semanas após a cirurgia estereotáxica cada animal passou por um registro de 24 horas para análise do ciclo sono-vigília de cada um, através do método de Louis (62). Neste método, 3 etapas para a classificação de cada fase do ciclo são necessárias, baseadas em algoritmos estabelecidos pela quantificação das potências de EMG e de EEGc (bandas α : 10.5–15 Hz, β : 22–30 Hz, γ : 35–45 Hz, δ : 1.5–6 Hz e Θ : 6–10 Hz). Desta forma, temos:

- 1) *Determinação de vigília/sono*: Se a potência muscular estiver alta o animal está em vigília atenta ou, se baixa, parte-se para a próxima etapa;
- 2) *Determinação de NREM*: Se a relação $(\delta \times \alpha)/(\beta \times \gamma)$ está alta o animal está em sono NREM e, se baixa, parte-se para a última etapa;
- 3) *Determinação de REM*: se a relação $\Theta/(\delta \times \alpha)$ está alta o animal está em sono REM e, se baixa, o animal está em vigília relaxada.

A partir deste modelo uma rotina foi desenvolvida, utilizando o programa Chart 5 for Windows (*PowerLab/8SP; AD Instruments, Austrália*) para realizar o estagiamento do sono em tempo real, de maneira que fosse possível ativar um eletroestimulador com descargas de amplitude e largura de pulsos suficientes para estimular as crises epiléticas nos animais em cada fase do ciclo sono-vigília.

3.6 Indução das crises epiléticas

Os estímulos elétricos gerados na amígdala consistiam de pulsos quadrados e bifásicos, de 1 ms cada, numa frequência de 60 Hz, durante 2 s por dia. Estes foram feitos através do sistema de aquisição de dados *PowerLab v.8*, que permite a indução de estímulos através de tensão elétrica. Para cada animal, um limiar de pós-descarga foi estabelecido no dia seguinte ao registro basal do ciclo sono-vigília.

Para determinação do limiar da pós-descarga, vários estímulos foram aplicados na ABL, de forma crescente, partindo de uma tensão de 3V, com um intervalo de 15 minutos entre um estímulo e outro. Assim que o animal respondia ao estímulo, estes eram cessados. O limiar de pós-descarga foi compreendido como a intensidade mínima de estímulo capaz de gerar resposta eletroencefalográfica na região estimulada, acompanhada de manifestação corporal. Essa intensidade foi mantida constante durante todo o procedimento experimental.

O protocolo diário para indução de crises consistiu em registro basal de no mínimo 30 minutos, para estabilização da FC e adaptação do animal. Nos grupos cujo abasamento foi feito durante o sono esse período se prolongou até que o animal se mantivesse na fase respectiva de cada grupo, sendo o estímulo deflagrado após, no mínimo, 10 segundos de sono REM ou 30 segundos de sono NREM. O período imediatamente antes de cada indução é chamado de pré-ictal (antes da crise). Após estabilização, os estímulos foram deflagrados e o padrão comportamental e eletroencefalográfico observados até o final da PD, período denominado de ictal (durante a crise). Após o período ictal, os animais foram registrados por mais 20 minutos, correspondentes ao período pós-ictal (após a crise) (Figura 3).

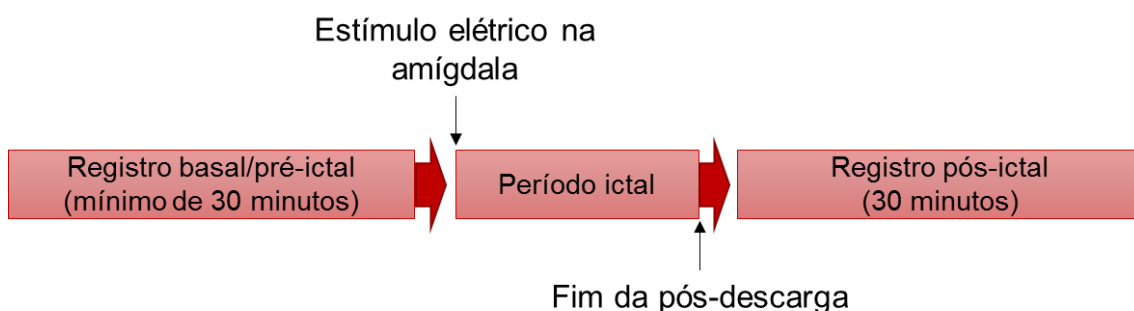


Figura 3 - Figura esquemática do protocolo de deflagração diária de estímulos elétricos na região basolateral da amígdala direita.

Os animais foram estimulados a cada 24 horas e o padrão comportamental e eletroencefalográfico dos animais foi analisado segundo os critérios de Racine (60). Os animais só foram considerados completamente abasados quando exibiram três crises generalizadas estágio 5 em dias

consecutivos. Todos os estímulos (desde o início do abasamento até a última crise convulsiva em E5) foram feitos na fase do ciclo sono-vigília respectiva de cada grupo experimental.

3.7 Variabilidade da Frequência Cardíaca

Para avaliação da FC e da VFC considerou-se os intervalos entre um batimento e outro a partir da onda R do ECG dos animais (intervalos R-R). Foram analisados os registros antes do início dos estímulos e após três dias de crises estágio 5. Coletou-se os intervalos R-R de um período de 5 minutos de cada um desses registros e os dados foram transferidos para o programa *CardioSeries* v2.4, analisados de forma linear (tanto no domínio do tempo quanto no domínio da frequência) e não linear (análise simbólica) da VFC.

3.8 Função cardíaca e susceptibilidade a arritmias *ex vivo*

No dia seguinte ao do último estímulo os animais foram eutanasiados por decapitação para procedimentos de análise de função cardíaca e reatividade vascular *ex vivo*.

Para análise da função cardíaca *ex vivo* utilizou-se a técnica de Langendorff para corações isolados sob pressão constante. Para isso, os animais foram decapitados 15 minutos após administração de heparina (400 UI, i.p.) e tiveram a cavidade torácica exposta. Cada coração foi rápida e cuidadosamente dissecado e, através de uma cânula, e perfundido por solução de Krebs Ringer a 37° C, saturada com solução carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e contendo, em mM: NaCl 118.4, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ · 7H₂O 1.2, CaCl₂ · 2H₂O 2.5, glucose 11.7, e NaHCO₃ 26.5. Um balão preenchido com água e conectado a um transdutor de pressão (MLT0699 *ADInstruments*) foi introduzido no ventrículo esquerdo através de uma incisão feita no átrio esquerdo. Através deste transdutor, sinais biológicos de pressão intraventricular foram registrados e lidos pelo sistema de aquisição de dados *BioPac Systems MP100* (Goleta, CA, EUA) (Figura 4).

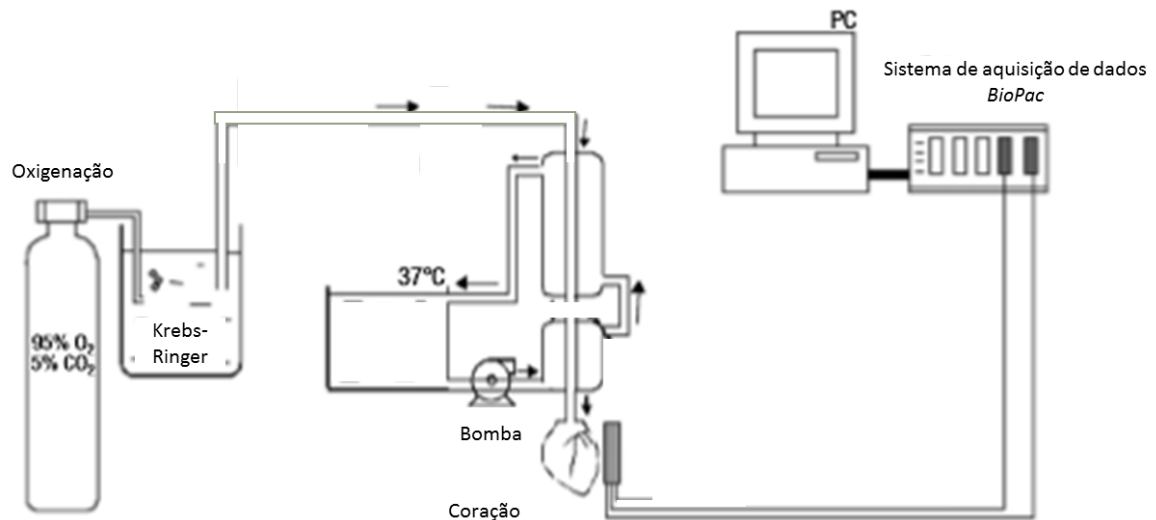


Figura 4 - Esquema de montagem de Sistema de Langendorff para experimento de coração isolado. (Fonte: adaptado de Chorro; Such-Belenguer; López-Merino, 2009) (78).

O protocolo de análise da função cardíaca consistia em registro basal de 30 minutos, necessários para estabilização de todo o sistema, seguido por 15 minutos de isquemia e 30 minutos de reperfusão (Figura 5). Para isquemia, a artéria coronária descendente anterior foi ocluída fisicamente com o auxílio de uma linha enlaçada na mesma. Após o período isquêmico o nó que ocluída a artéria foi desfeito para que o fluxo coronariano fosse reestabelecido.

Em todas as fases do protocolo foram observados e analisados os seguintes parâmetros cardíacos: Pressão Intraventricular Sistólica (PIS), Pressão Intraventricular Diastólica (PID), derivada da pressão/Derivada do tempo durante a sístole ($dP/dt +$) e a diástole ($dP/dt -$) ventricular, FC intrínseca (FCI) e fluxo coronariano. Também foi possível se avaliar a susceptibilidade a arritmias pós isquemia, seguindo protocolo sugerido por Savergnini *et al.* (79). Nele, considera-se o tempo de taquicardia e/ou fibrilação ventricular após a oclusão da artéria coronária esquerda ser revertida, que é classificado em: Fator 2: duração entre 0 a 3 minutos; Fator 4: duração entre 3 e 6 minutos; Fator 6: 6 a 10 minutos; Fator 8: 10 a 15 minutos; Fator 10: 15 a 20 minutos; Fator 11: 20 a 25 minutos; Fator 12: 25 a 30 minutos; Arritmia irreversível: duração maior que 30 minutos (79).

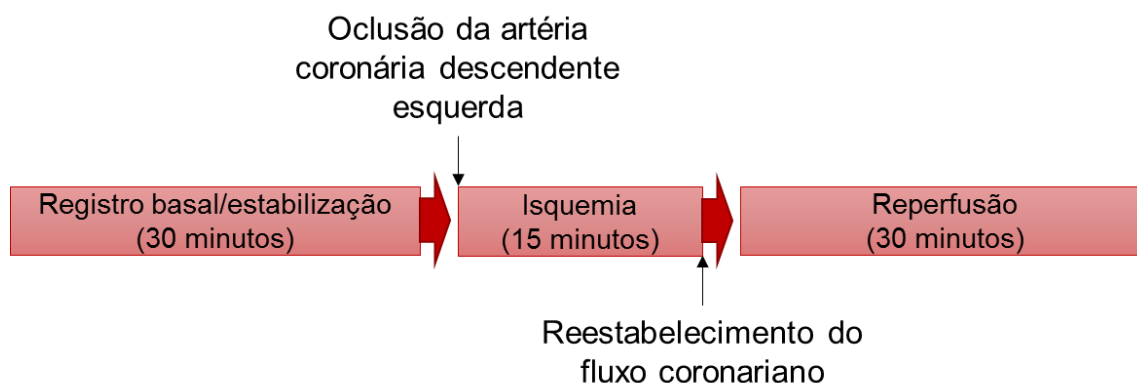


Figura 5 - Figura esquemática do protocolo para análise de função cardíaca através da técnica de Langendorff para corações isolados.

Após rápida retirada do coração dos animais para experimento de função cardíaca, a artéria aorta torácica dos animais foi retirada para análise de reatividade vascular. A aorta foi dividida em 4 anéis de 4 mm cada. Cada anel foi mantido em uma cuba de banho de órgãos contendo solução de Krebs-Henseleit a 37° C, saturada com solução carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e contendo, em mM: NaCl 110,8; KCl 5,9; MgSO₄ 1,07; NaH₂PO₄ 2,33; CaCl₂ 2,49; Glicose 11,51; NaHCO₃ 25,0. Em cada cuba, uma haste metálica foi acoplada tanto ao anel quanto a um transdutor de força (*Insight*, Brasil) para registro da atividade mecânica vascular. Os sinais foram, então, lidos pelo sistema de aquisição de dados *Dataq Instruments MP100* (Goleta, CA, EUA) (Figura 6).

O protocolo para análise da reatividade vascular consistia, basicamente, de um teste de capacidade de relaxamento seguido de dois testes de capacidade de contração. Dois dos anéis foram mantidos com endotélio, para análise de função endotelial vascular, e os outros dois tiveram o endotélio mecanicamente removidos, para análise de função muscular vascular. Dessa forma, após um período de estabilização de 1 hora (com troca da solução a cada 15 minutos) em que a tensão foi mantida a 1,5 g sobre os anéis, os testes foram iniciados. Primeiramente os anéis aórticos foram pré-contraídos com fenilefrina 10⁻⁷ mol/L. Após o ápice do efeito constritor da mesma (cerca de 6 a 7 minutos após administração), curvas de relaxamento foram feitas em todas as cubas. Nos anéis em que o endotélio foi mantido, a curva foi feita com nove concentrações, crescentes e acumulativas, de acetilcolina (10⁻⁹ a 10⁻⁵ mol/L), com intervalo de

40 segundos entre elas. Nos anéis em que o endotélio foi removido, a curva foi feita com treze concentrações, crescentes, de nitroprussiato de sódio (10^{-11} a 10^{-5} mol/L), também com intervalo de 40 segundos entre elas. Após novo período de estabilização do sistema (30 minutos, com troca de solução a cada 15 minutos), foi iniciado o teste de contração. Para isso, em todos os anéis foram feitas curvas com administração de 9 concentrações de felinefrina (10^{-9} a 10^{-5} mol/L). Após o terceiro período de estabilização (30 minutos, com troca de solução a cada 15 minutos), novo teste de contração vascular foi feito, utilizando solução de Krebs-Ringer modificada com KCl 120 mM em todas as cubas (Figura 7). Importante ressaltar que, antes de todo o procedimento, um teste de presença ou ausência de endotélio era feito. Com base nas propriedades do mesmo, administrou-se acetilcolina 10^{-5} M em todas as cubas, após pré-contração com fenilefrina 10^{-7} M, sendo considerado anel com endotélio somente aqueles cuja porcentagem de relaxamento foi superior a 80 % e, sem endotélio, aqueles que não possuíam capacidade de relaxar.

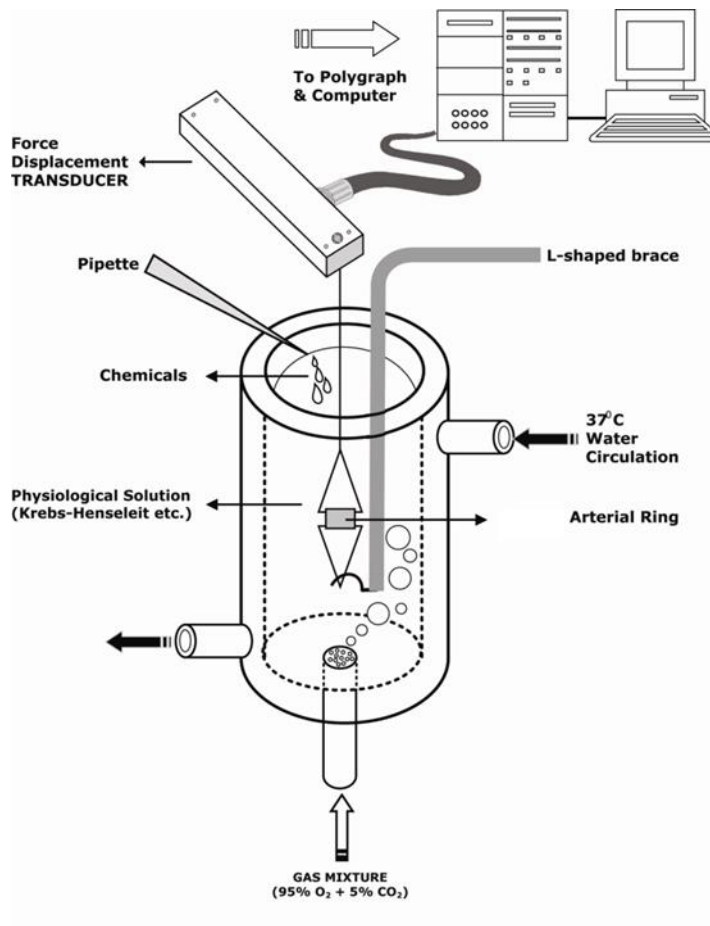


Figura 6 - Esquema de montagem de uma cuba de banho de órgãos utilizada para experimento de reatividade vascular. (Fonte: adaptado de YLDIZ; SEYREK; GUL. 1999) (80).

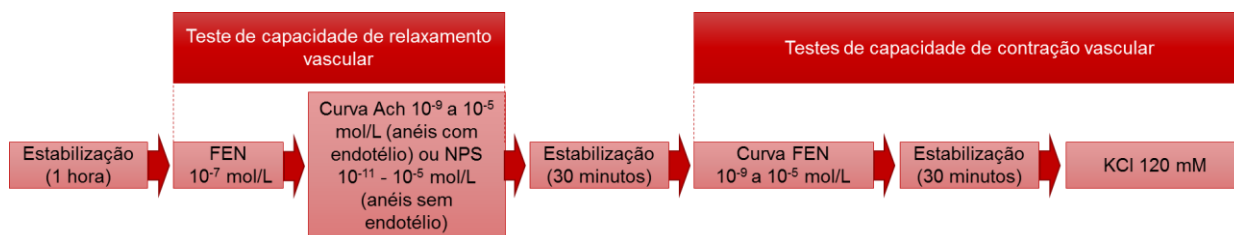


Figura 7 - Esquema representativo do protocolo de vaso isolado para testes de capacidade de contração e relaxamento aórtico após teste de endotélio. FEN: Fenilefrina; Ach: Acetilcolina; NPS: Nitroprussiato de Sódio; KCl: Cloreto de Potássio.

Todo o procedimento experimental realizado está sumarizado na Figura 8.

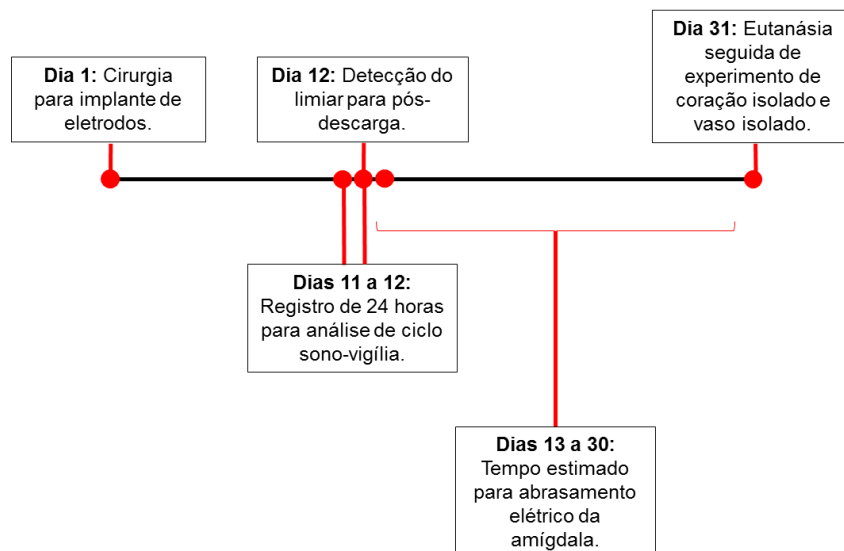


Figura 8 - Esquema representativo da ordem cronológica na qual todo o protocolo experimental foi feito, em cada animal.

4 RESULTADOS

Este estudo comparou as respostas cardiovasculares e eletroencefalográficas nos períodos peri-ictais (pré-ictal, ictal e pós- ictal) e interictal em ratos durante e após o processo de abrasamento elétrico da amígdala, de acordo com fases específicas do ciclo vigília-sono, a fim de elucidar o papel deste sobre aquelas respostas.

Os sinais EEGc e EMG foram registrados por um período de 24 horas para a detecção dos limiares de EMG, REM e NREM, como descrito por Louis *et al.* (62). Estes limiares foram obtidos de forma individualizada e para isto, a classificação visual das fases do sono, de acordo com o EEGc e EMG foram comparadas aos valores de EMG power, NREM power e REM power, cujo cálculo já foi descrito anteriormente (62).

As figuras 9, 10 e 11 representam um traçado típico de registros obtidos nas fases de vigília, NREM e REM. Nestas figuras também estão representados os limiares na faixa cinza. Desta forma, na figura 9 o espectro de potência do EMG (EMG power) encontra-se acima do limiar, logo, animal está em vigília. Da mesma forma, na figura 10, o EMG power encontra-se abaixo do limiar, ao passo que o NREM power encontra-se acima deste, caracterizando sono NREM. Por fim, na figura 11, observa-se o EMG power abaixo do limiar e REM power acima, classificando esta fase como de sono REM.

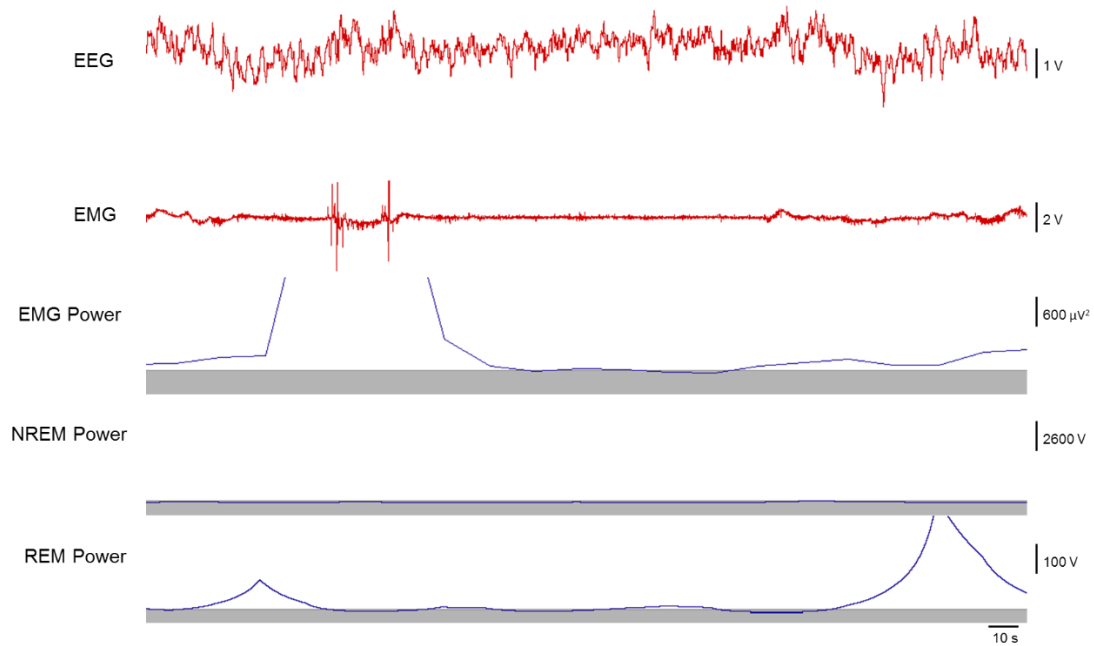


Figura 9 - Traçado eletroencefalográfico cortical e eletromiográfico característicos de estado de vigília. EMG Power indica a amplitude do EMG, enquanto que o NREM Power e REM Power indicam as razões entre ondas do EEG $(\delta \times \alpha)/(\beta \times \gamma)$ e $\Theta^2/(\delta \times \alpha)$, respectivamente. A faixa cinza representa o limiar.

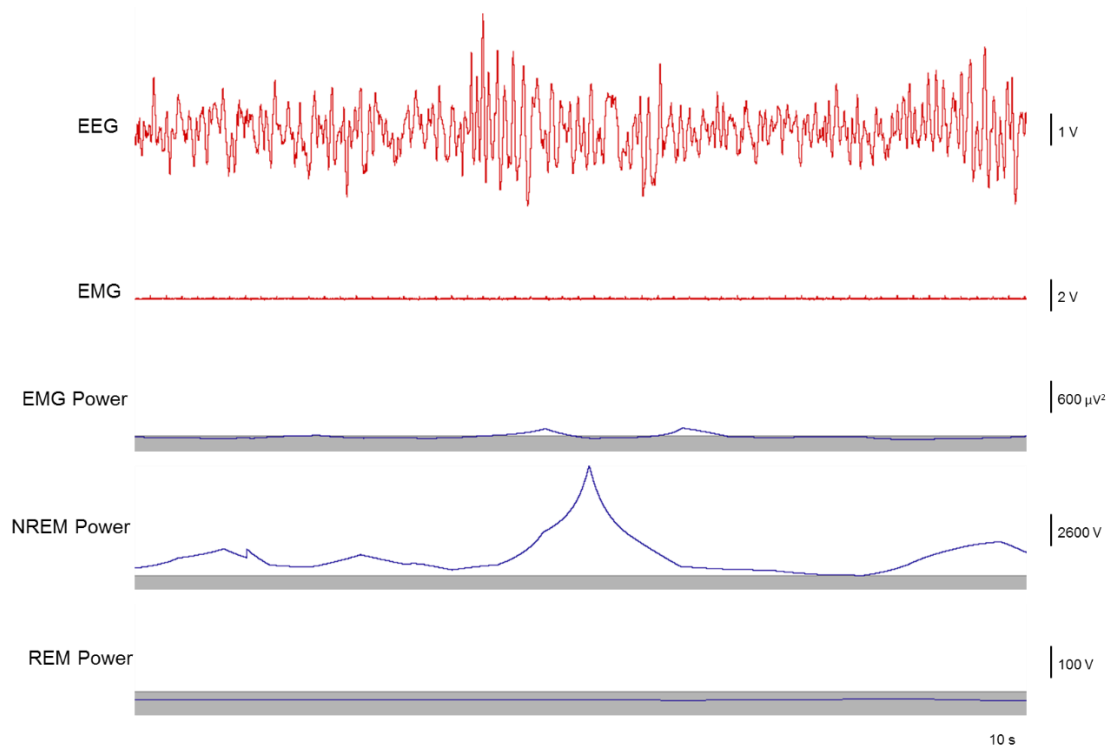


Figura 10 - Traçado eletroencefalográfico cortical e eletromiográfico característicos de estado sono NREM. EMG Power indica a amplitude do EMG, enquanto que o NREM Power e REM Power indicam as razões entre ondas do EEG $(\delta \times \alpha)/(\beta \times \gamma)$ e $\Theta^2/(\delta \times \alpha)$, respectivamente. A faixa cinza representa o limiar.

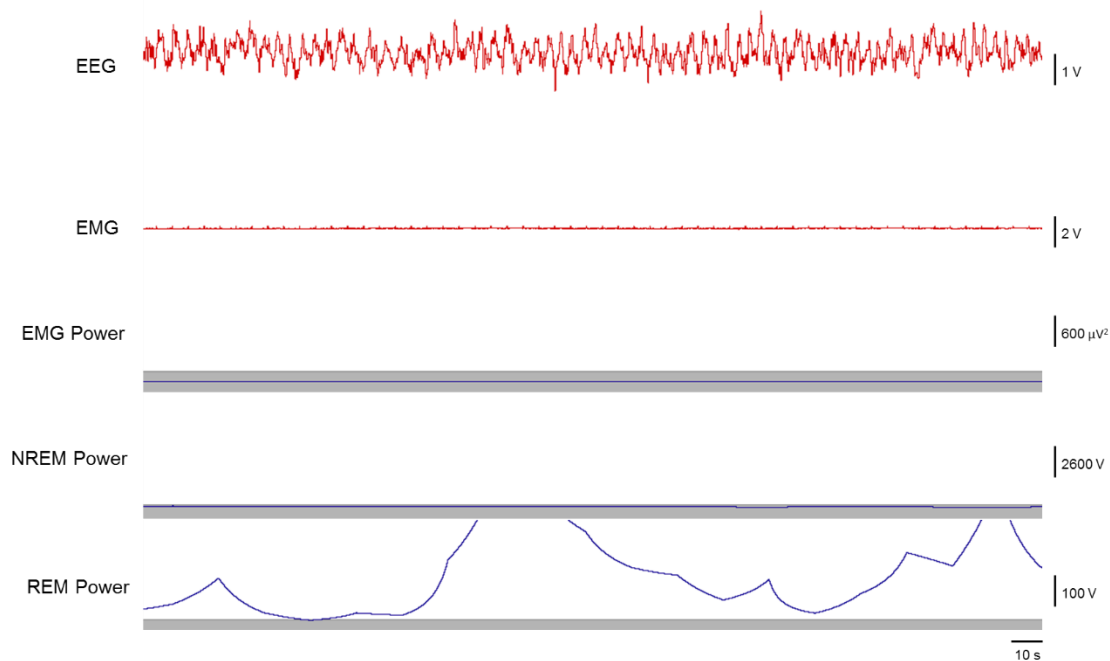


Figura 11 - Traçado eletroencefalográfico cortical e eletromiográfico característicos de estado sono NREM. EMG Power indica a amplitude do EMG, enquanto que o NREM Power e REM Power indicam as razões entre ondas do EEG $(\delta \times \alpha)/(\beta \times \gamma)$ e $\Theta^2/(\delta \times \alpha)$, respectivamente. A faixa cinza representa o limiar.

4.1 Abrasamento elétrico da amígdala

Observou-se que o tempo em que os animais permaneceram em cada estágio da escala de Racine não foi diferente entre os grupos, porém o tempo gasto, em dias, para o abrasamento total da amígdala foi menor do grupo NREM quando comparado aos demais grupos. No grupo vigília esse tempo foi de $17,6 \pm 2,1$ dias e no grupo REM de $13,8 \pm 2,1$ dias, enquanto que no grupo NREM foi de $12,0 \pm 1,0$ dias (Figura 12). A duração da pós-descarga não foi diferente entre os grupos em nenhum dos estágios de Racine (Figura 13).

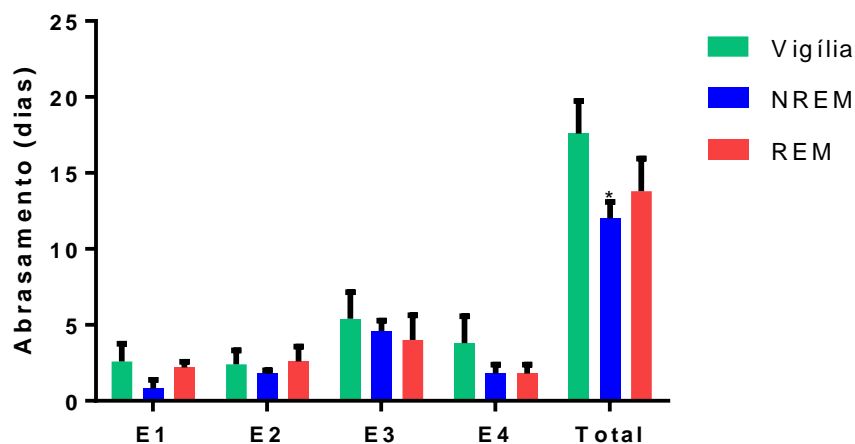


Figura 12 - Tempo em que os animais permaneceram em cada estágio de Racine e tempo total necessário para abrasamento elétrico da amígdala. Resultados expressos em média \pm EPM. * NREM ou REM x Vigília. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. $p < 0,05$, $n=5$.

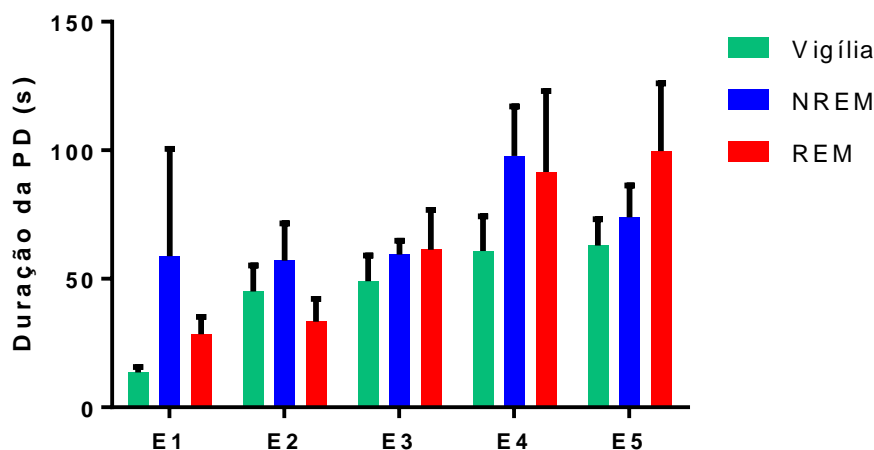


Figura 13 – Duração da pós-descarga em cada estágio do abrasamento feito em diferentes fases do ciclo sono-vigília. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. $p < 0,05$, $n=5$.

4.2 Arritmias

Em todos os grupos foi observado a presença de extra-sístoles, bloqueios átrio-ventriculares e bloqueios sinusais durante as crises E5 dos animais. Considerando-se o período pré-ictal, compreendido de um período mínimo de 20 minutos, apenas no grupo REM foram encontrados bloqueios átrio-ventriculares. Alguns bloqueios átrio-ventriculares foram encontrados no grupo REM e bloqueios sinusais no grupo Vigília no período pós-ictal (20-30 minutos) (Tabela 1). Importante notar que, nos grupos NREM e REM foram encontradas extra-sístoles bigeminadas e em salva (Figura 14, Tabela 2).

Tabela 1 – Distribuição das arritmias encontradas antes, durante e após crises (E5) induzidas em diferentes fases do ciclo sono-vigília

Arritmia	Grupo	Período pré-ictal (/1000 batimentos)	Período ictal (/1000 batimentos)	Período pós-ictal (/1000 batimentos)
Extra-sístole	Vigília	0,05 ± 0,03	7,27 ± 2,45	0,20 ± 0,10
	NREM	2,95 ± 2,92	7,07 ± 2,82	25,96 ± 25,96
	REM	0,13 ± 0,13	6,38 ± 2,61	0,80 ± 0,80
Bloqueio átrio-ventricular	Vigília	0	2,07 ± 0	0
	NREM	0	6,75 ± 3,22	0
	REM	0,01 ± 0	10,56 ± 9,0	0,03 ± 0
Bloqueio sinusal	Vigília	0	0	0,10 ± 0
	NREM	0	1,52 ± 0	0
	REM	0	1,60 ± 0	0

Resultados em média ± EPM. One-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey.

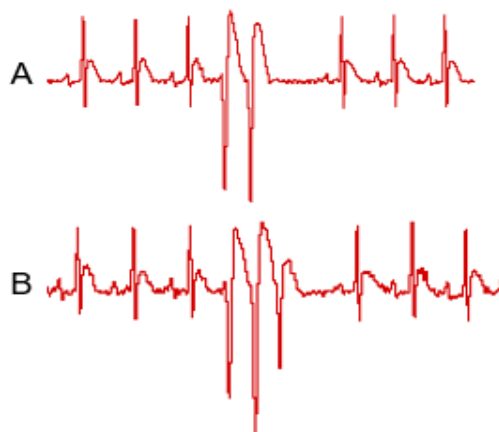


Figura 14 – Exemplo de extra-sístole bigeminada (A) e em salva (B), encontradas nos registros de ECG dos animais dos grupos NREM e REM.

Tabela 2 - Distribuição de extra-sístoles bigeminadas ou em salva encontradas entre crises e após crises (E5) induzidas em diferentes fases do ciclo sono-vigília.

Grupo	Período interictal		Período ictal	
	ES bigeminadas	ES em salvas	ES bigeminadas	ES em salvas
Vigília	1	0	0	0
NREM	25	3	4	0
REM	0	0	1	1

ES: Extra-sístoles.

4.3 Parâmetros cardíacos *in vivo*

Avaliando-se o ECG antes do início do protocolo de abrasamento (basal) e após o término do mesmo (final), sempre em períodos de vigília dos animais, nenhuma diferença significativa foi encontrada na FC (Figura 15) e na VFC, tanto na análise linear, no domínio do tempo (Figura 16) e da frequência (Figura 17), quanto na não linear (análise simbólica) (Figura 18).

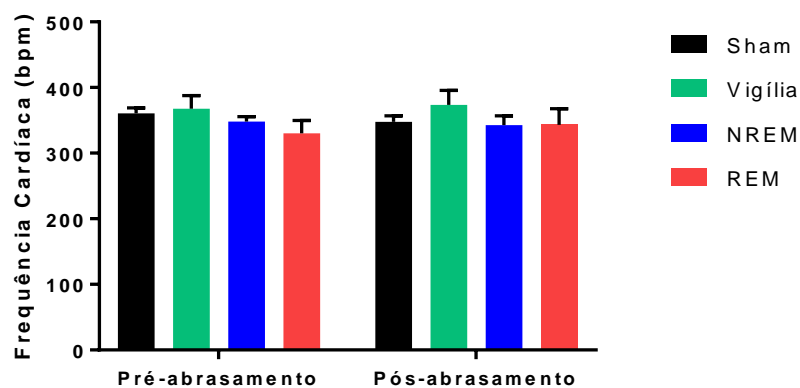


Figura 15 – Análise da FC comparando-se os grupos antes (pré) e após (pós) o abrasamento elétrico da amígdala. Resultados expressos em média \pm EPM, $n=5$. Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey.

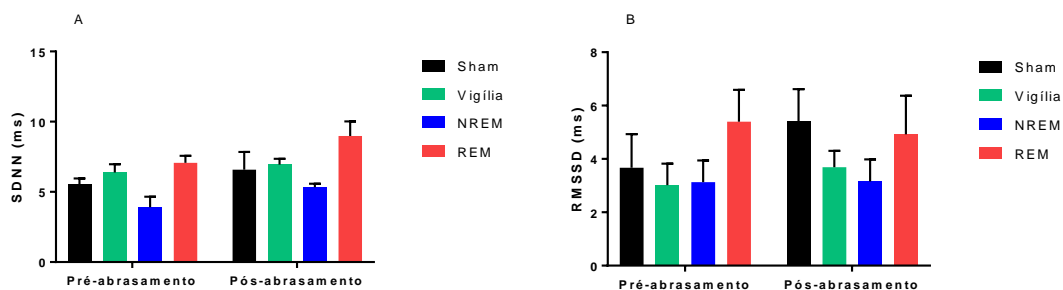


Figura 16 – Análise da VFC no domínio do tempo comparando-se os grupos antes (pré) e após (pós) o abrasamento elétrico da amígdala. (A) SDNN; (B) RMSSD. Resultados expressos em média \pm EPM, $n=4$. Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey.

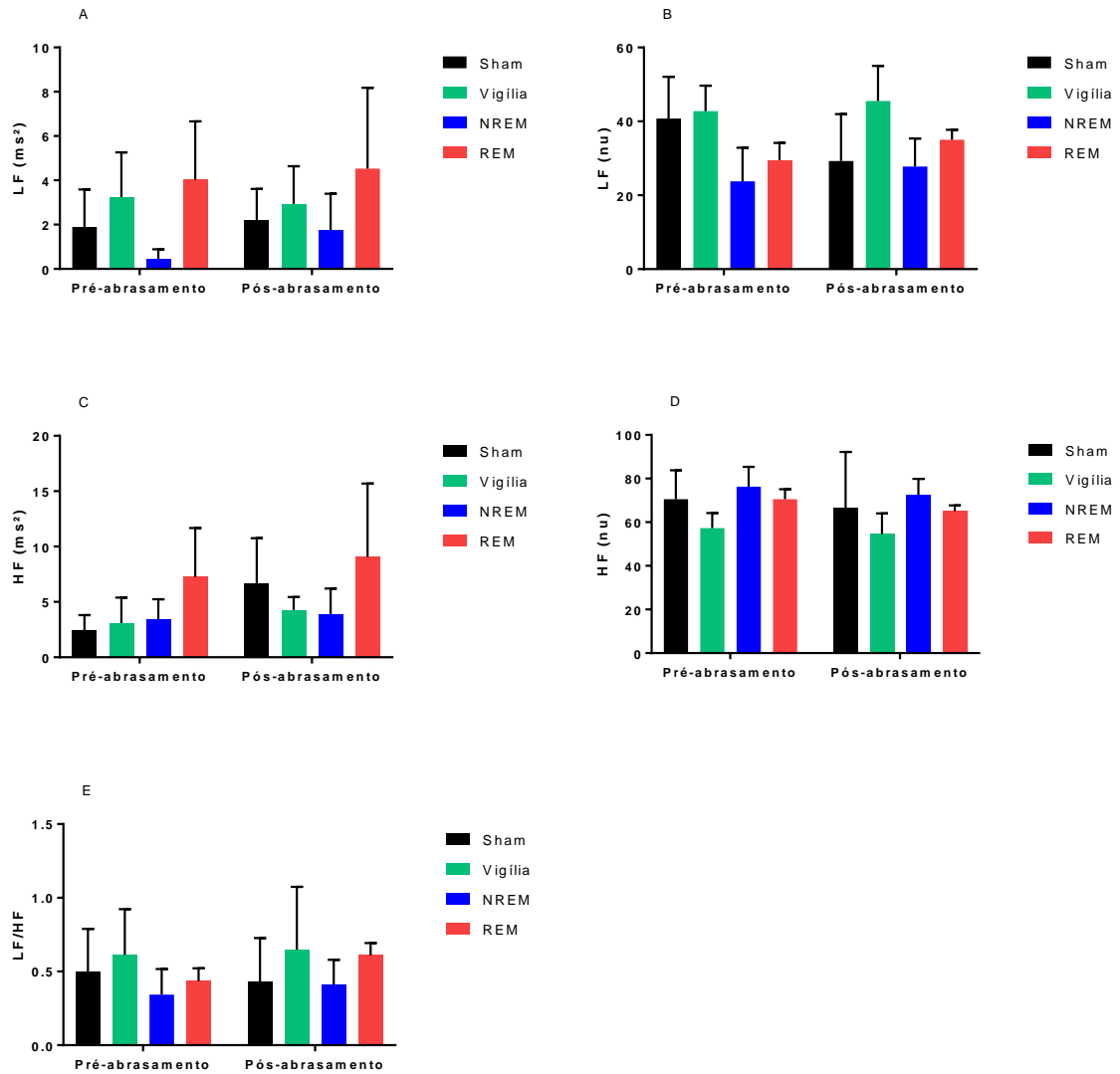


Figura 17 – Análise da VFC no domínio da frequência comparando-se os grupos antes (pré) e após (pós) o abrasamento elétrico da amígdala. (A) LF (ms^2); (B) LF (nu); (C) HF (ms^2); (D) HF (nu); LF/HF. Resultados expressos em média \pm EPM, $n=4$. Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey.

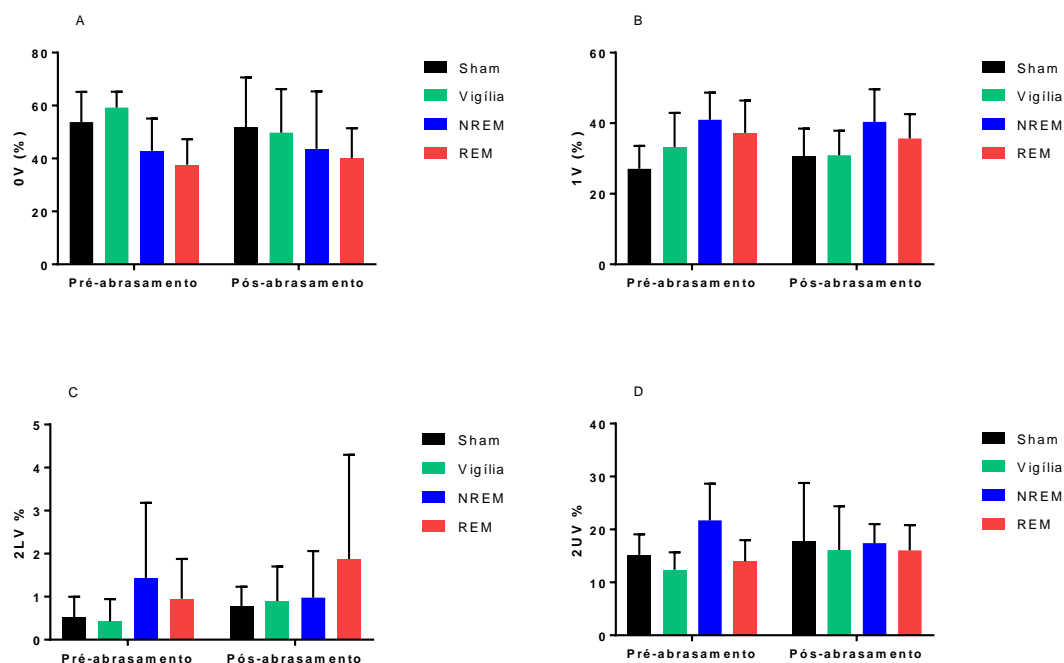


Figura 18 - Análise simbólica da VFC comparando-se os grupos antes (pré) e após (pós) o abrasamento elétrico da amígdala. (A) 0V (%); (B) 1V (%); (C) 2LV (%); (D) 2UV (%). Resultados expressos em média \pm EPM, n=4. Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Para verificar o padrão de resposta da FC no período peri-ictal, a FC basal média, foi comparada à FC média após um minuto do término da crise. Para esta análise, optou-se sempre pela FC basal no período de vigília, em todos os grupos, a fim de tentar anular o efeito do despertar sobre este parâmetro nos grupos NREM e REM. A Figura 19 demonstra que houve uma taquicardia pós-ictal no grupo NREM desde E2 até E4. Este resultado não foi visto nos demais grupos (Tabela 3). Nota-se que em E3 e em E4 a FC basal no grupo REM encontra-se mais baixa quando comparada com a do grupo Vigília, porém esse resultado não se manteve até o fim do protocolo de abrasamento (Figura 19).

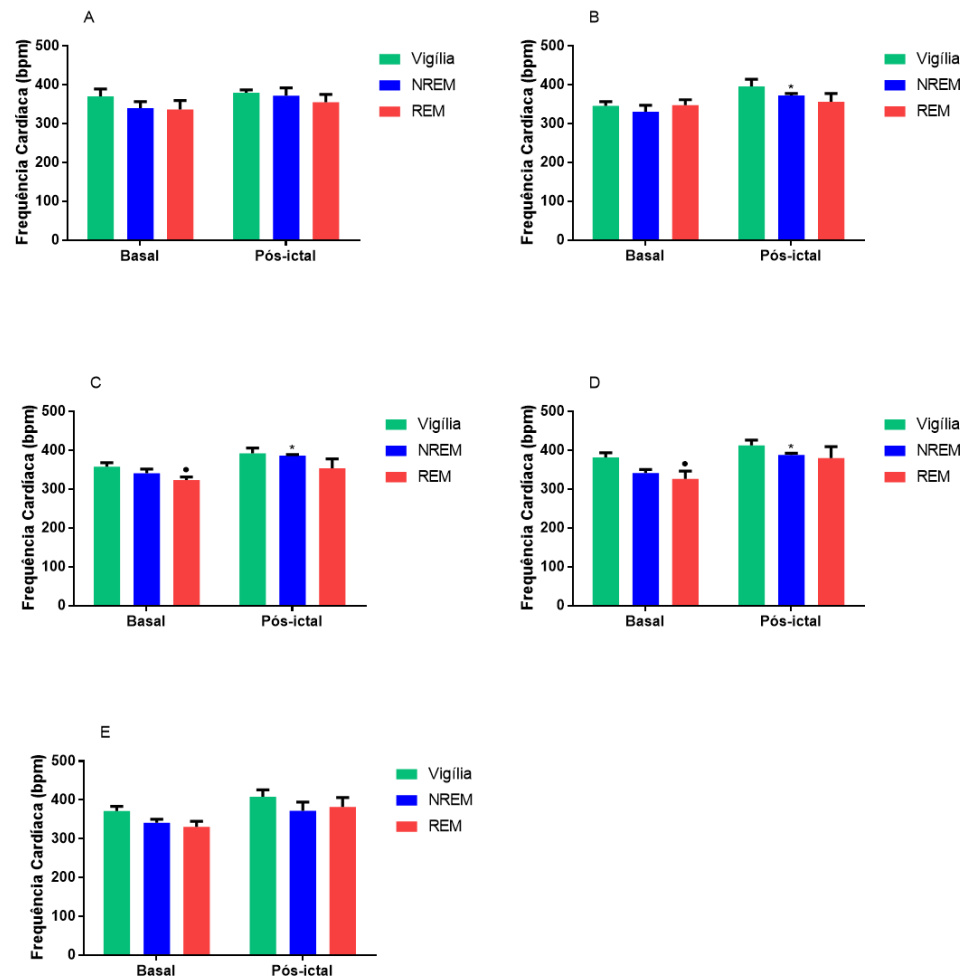


Figura 19 – FC basal e pós-ictal dos grupos abrasados em Vigília, NREM e REM em todos os estágios da escala de Racine. (A) Estágio 1; (B) Estágio 2; (C) Estágio 3; (D) Estágio 4; (E) Estágio 5. Resultados expressos em média \pm EPM. *Pós-ictal x Basal. •REM x Vigília. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, $n = 5$.

Tabela 3 – Resultados da FC basal e pós-ictal dos animais abrasados em Vigília, NREM e REM em todos os estágios da escala de Racine.

Estágio do abrasamento	Grupo	FC basal	FC pós-ictal	p
E1	Vigília	370,5 ± 19,3	379,8 ± 7,4	0,2570
	NREM	340,1 ± 16,7	372,3 ± 20,6	0,3496
	REM	336,8 ± 22,9	355,6 ± 19,8	0,5527
E2	Vigília	346,1 ± 10,8	396,3 ± 18,4	0,0577
	NREM	331,2 ± 16,3	373,2 ± 5,0*	0,0398
	REM	347,5 ± 14,4	356,4 ± 21,6	0,7409
E3	Vigília	358,0 ± 10,6	392,5 ± 13,8	0,0825
	NREM	341,2 ± 11,0	386,8 ± 2,5*	0,0038
	REM	323,4 ± 8,1	345,2 ± 24,0	0,2707
E4	Vigília	382,0 ± 11,9	412,6 ± 14,3	0,1406
	NREM	341,7 ± 9,3	388,4 ± 4,8*	0,0022
	REM	326,9 ± 19,7	380,0 ± 29,9	0,1779
E5	Vigília	371,3 ± 12,0	408,4 ± 17,1	0,1212
	NREM	341,6 ± 8,6	372,4 ± 22,2	0,2330
	REM	330,6 ± 14,4	382,3 ± 24,2	0,1042

Resultados em média ± EPM. *Pós-ictal x Basal, t-test , n=5.

Analisando-se a FC instantânea (FCI) mínima e máxima atingidas no período ictal, observou-se uma bradicardia seguida de uma taquicardia rebote em todos os grupos. Este padrão de resposta foi unânime apenas no estágio 5. Nos grupos Vigília e NREM, inicialmente (E2 e E3) houve apenas a taquicardia ictal, sendo a bradicardia evidenciada apenas nas crises generalizadas (E4 e E5). Já no grupo REM, a taquicardia foi persistente em todos os estágios, com exceção em E2, ao passo que a bradicardia somente aconteceu em E5. Nota-se que, em algumas fases do abrasamento, a FC pré-ictal do grupo REM foi diferente quando comparada com o grupo Vigília (Figura 20). Em E5, a porcentagem de bradicardia e de taquicardia no período ictal em relação ao pré-ictal não foi diferente entre os grupos (Figura 21). Quando comparamos o tempo de latência para a FCI mínima, não há diferença entre os grupos nos estágios E4 e E5, porém o grupo REM demora menos tempo que o grupo NREM para atingir a FCI máxima, em E4 (Figura 22). A Figura 23 é representativa do padrão da FC nos períodos pré-ictal, ictal e pós-ictal. A Figura 24 é um registro representativo de um animal do grupo Vigília, cujo padrão de resposta é similar aos demais grupos.

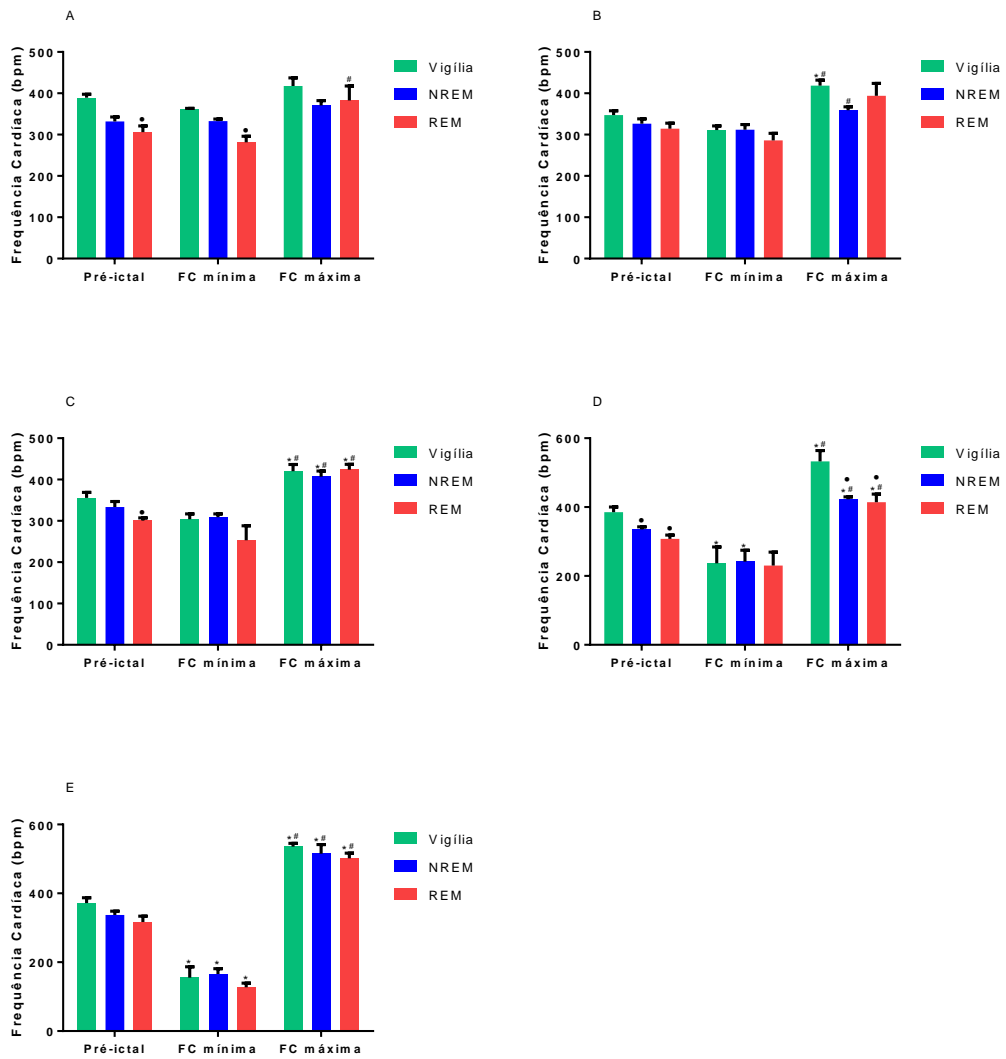


Figura 20 – FC instantânea mínima e máxima atingidas durante o período ictal em todos os estágios da escala de Racine. (A) Estágio 1; (B) Estágio 2; (C) Estágio 3; (D) Estágio 4; (E) Estágio 5. Resultados expressos em média \pm EPM. • NREM ou REM x Vigília; * FC máxima ou FC mínima x Pré-ictal. # FC máxima x FC mínima. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, $n = 4$.

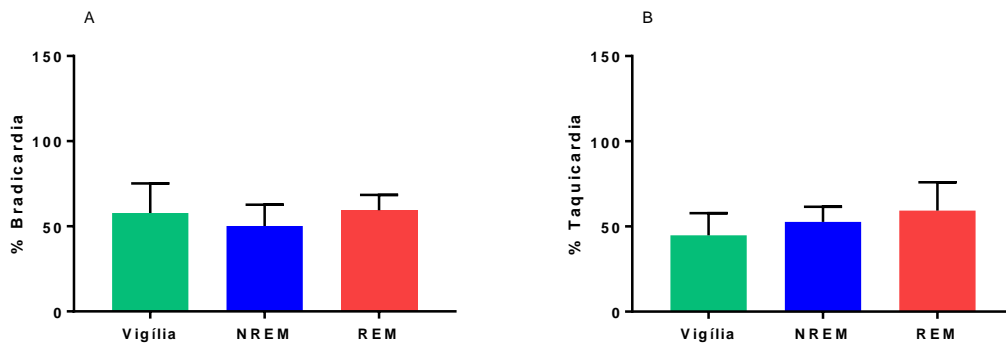


Figura 21 – Porcentagem de bradicardia (A) e de taquicardia (B), em E5, no período ictal comparado com o período pré-ictal. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $n=4$.

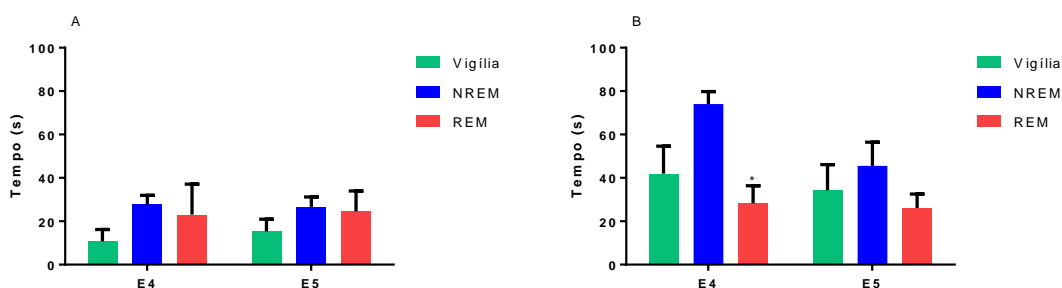


Figura 22 – Tempo de latência para FC instantânea mínima (A) e máxima (B) durante o período ictal nos estágios 4 e 5 da escala de Racine. Resultados expressos em média \pm EPM. * REM x NREM. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p<0,05$, $n=4$.

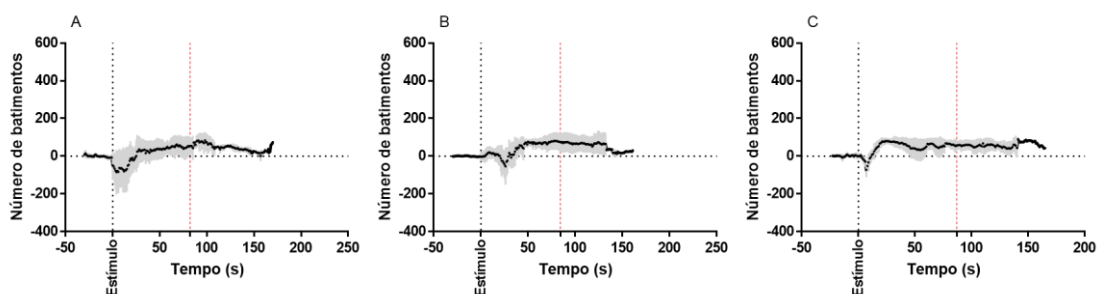


Figura 23 – Figura representativa da variação da FC ictal e pós-ictal em comparação com a média da FC pré-ictal, desde 30 segundos antes do estímulo elétrico até 60 segundos após o término da crise (E5). (A) Grupo Vigília; (B) Grupo NREM; (C) Grupo REM. Cada ponto indica a média de cada segundo durante todo o tempo da análise. A linha pontilhada vertical preta indica o momento do estímulo e a vermelha indica a média da duração da pós-descarga.

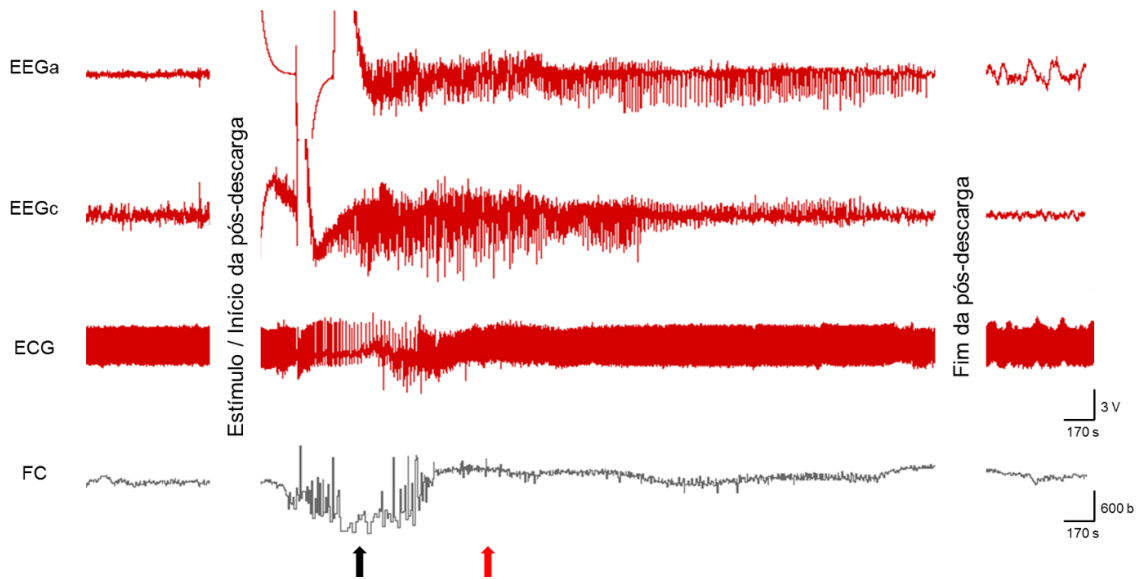


Figura 24 – Registro de EEGa, EEGc, ECG e de FC de um animal do grupo Vigília, demonstrando a bradicardia seguida pela taquicardia que ocorrem no período ictal que ocorrem de maneira similar em todos os grupos. A seta preta aponta para o momento da bradicardia e a vermelha para a taquicardia rebote.

4.4 Relação entre a PGES e a FC

Considerou-se como PGES uma diminuição da frequência e amplitude do EEGc, após o término da pós-descarga, em relação ao período basal. No grupo REM, em E4, a duração da PGES é maior quando comparada com o grupo Vigília (Figura 25). A Figura 26 mostra um traçado representativo da PGES de um rato do grupo vigília e um do grupo REM.

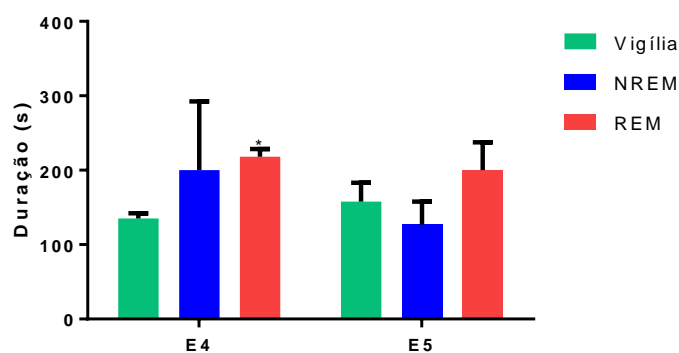


Figura 25 – Duração da supressão pós-ictal do EEG nos estágios 4 e 5 da escala de Racine. Resultados expressos em média \pm EPM. * REM x Vigília. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, $n=4$.

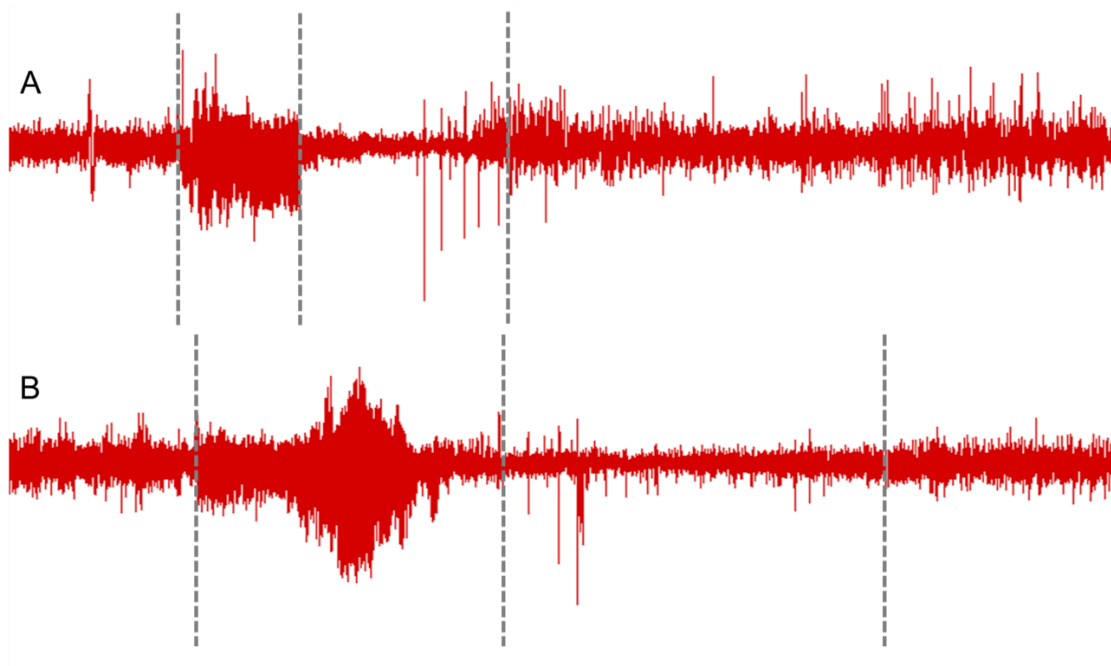


Figura 26 – Registro de EEGc de animal estimulado em estado de Vigília (A) e de sono REM (B) em E4. Em ambos os registros, entre as duas primeiras linhas verticais tracejadas está o período de pós-descarga e entre a segunda e terceira linha o período de PGES.

Importante notar que nos grupos NREM e REM, durante todo o período de PGES, a FC permaneceu aumentada quando comparada com o período pré-ictal. Por outro lado, no grupo Vigília, observa-se uma redução da FC durante a PGES em relação ao período ictal, atingindo valores similares aos do período pré-ictal do mesmo grupo (Figura 27). A Figura 28 é um registro representativo de animal do grupo Vigília que evidencia esse resultado.

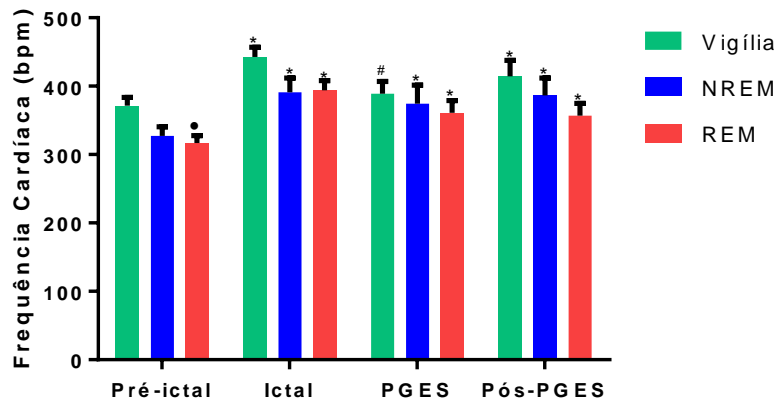


Figura 27 – Análise da FC nos períodos pré-ictal, ictal, durante e após a supressão pós-ictal do EEG em crises E5. Resultados expressos em média \pm EPM. • diferente em relação ao grupo Vigília; * diferente em relação ao período pré-ictal; # diferente em relação ao período ictal. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, $n = 5$.

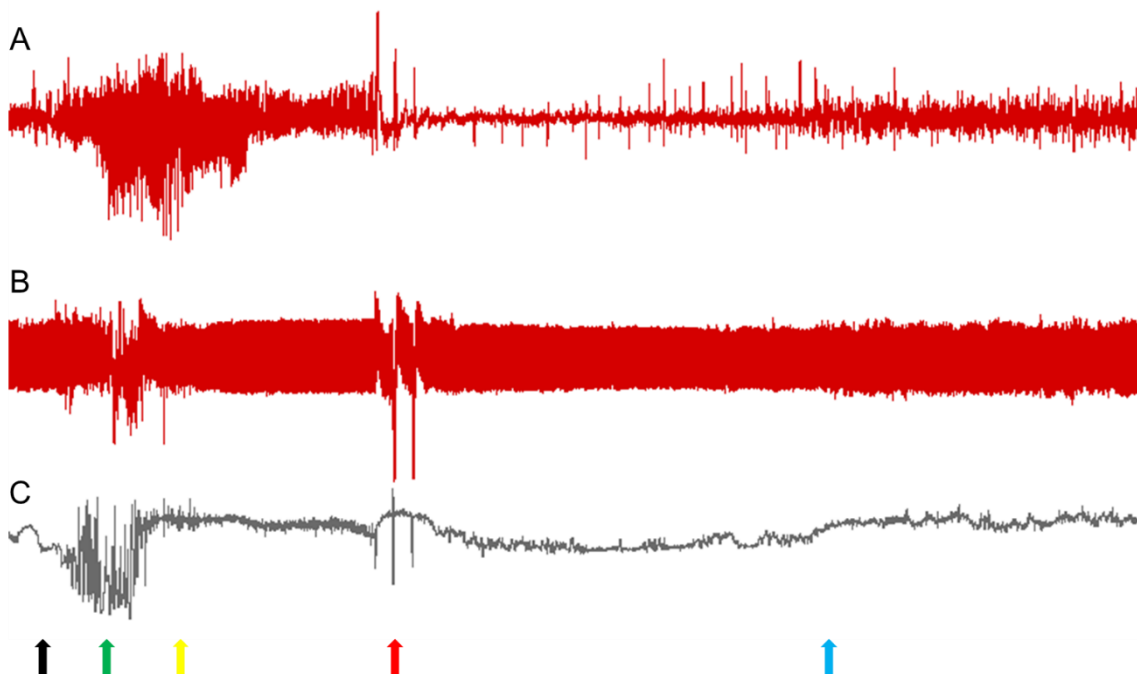


Figura 28 – Registro de EEGc (A), ECG (B) e FC (C) de animal estimulado em estado de Vigília em estágio E5. A seta preta aponta para o momento do estímulo elétrico, a vermelha para o fim da pós-descarga, a azul para o fim da PGES, a verde para a bradicardia ictal e a amarela para a taquicardia ictal. Nota-se uma diminuição da FC no período de PGES (entre as setas vermelha e azul).

4.5 Parâmetros cardiovasculares *ex vivo*

Através da técnica de Langendorff para corações isolados, observou-se que não há diferença significativa quando analisamos FC intrínseca (FCI), PAS, $dP/dt +$, $dP/dt -$ e PIDE antes e durante a isquemia, bem como no período de reperfusão em nenhum dos grupos analisados (Figura 29). Importante ressaltar

que o coração isolado de um rato do grupo Vigília e o de um rato do grupo REM não resistiram à isquemia, perdendo sua função após 15 minutos de oclusão da artéria coronária. No grupo Sham a média de fatores de arritmia após reversão da isquemia foi de $4,6 \pm 1,7$, enquanto que nos demais grupos, independente da fase do ciclo sono-vigília em que foram abراسados, a média de fatores foi 2 ± 0 .

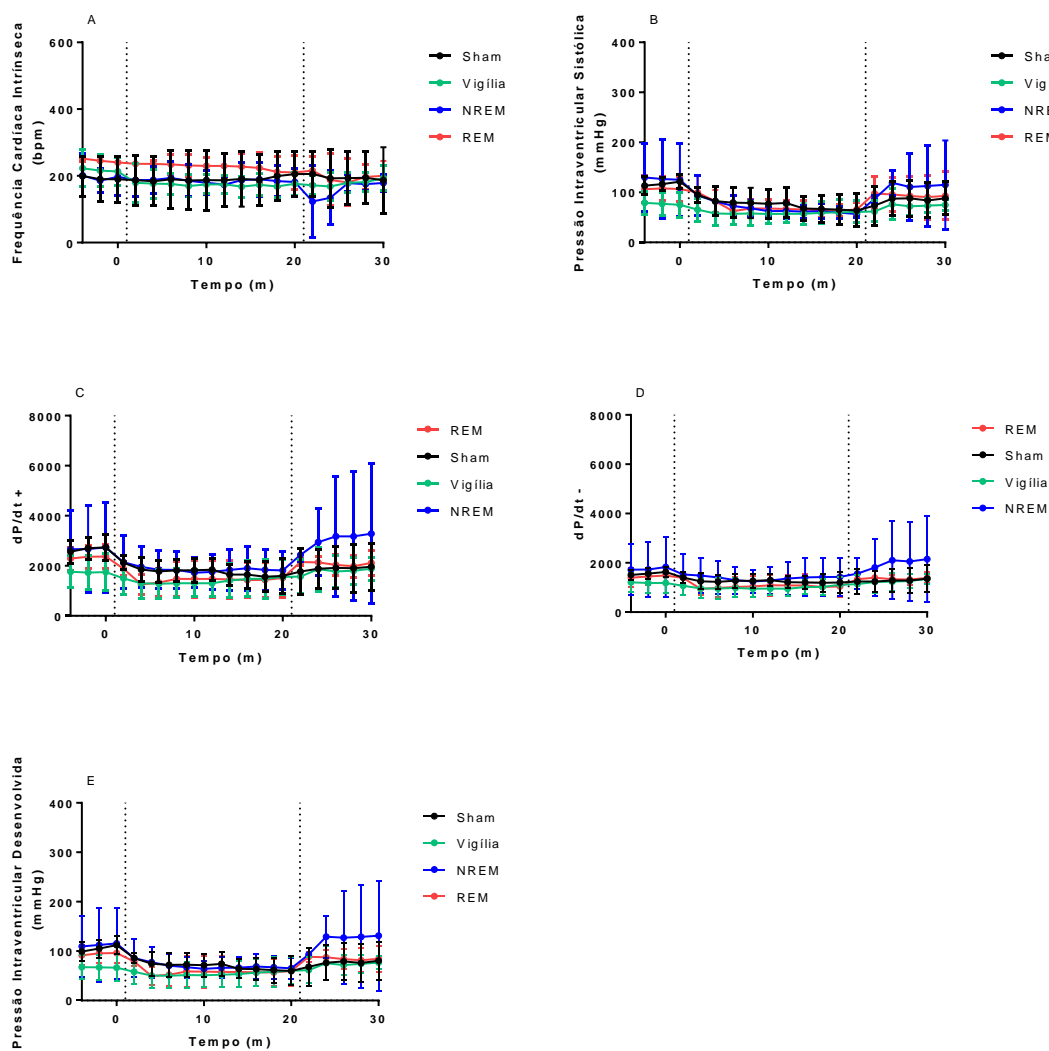


Figura 29 – Análise da FCI (A), PAS (B), dP/dt+ (C), dP/dt- (D) e PIDE (E) antes da oclusão da artéria coronária (valores que antecedem a primeira linha vertical pontilhada), durante a isquemia (valores entre as duas linhas verticais pontilhadas) e no período de reperfusão coronariana (após segunda linha vertical pontilhada) de corações isolados de ratos dos grupos Sham, Vigília, NREM e REM (Sham n=5, Vigília n=3, NREM n=2, REM n=2).

A porcentagem de contração vascular provocada pela fenilefrina em concentrações crescentes foi maior no grupo NREM quando comparada com os grupos REM e Vigília. Além disso, o grupo REM necessita de concentrações maiores de fenilefrina para possuir porcentagem de contração similar à dos grupos Sham e Vigília (Figura 30). Já com a solução modificada com maior concentração de KCl, observou-se que a porcentagem de contração foi maior no grupo vigília quando comparado com o grupo Sham (Figura 31). O teste de relaxamento vascular com administração de acetilcolina em doses crescentes e cumulativas mostrou que, a partir da segunda concentração administrada, o grupo REM foi capaz de relaxar mais, quando comparado com os demais grupos. Com a administração de nitroprussiato de sódio, todos os grupos que foram abrasados começaram a relaxar com concentrações maiores quando comparados com o grupo Sham (Figura 32).

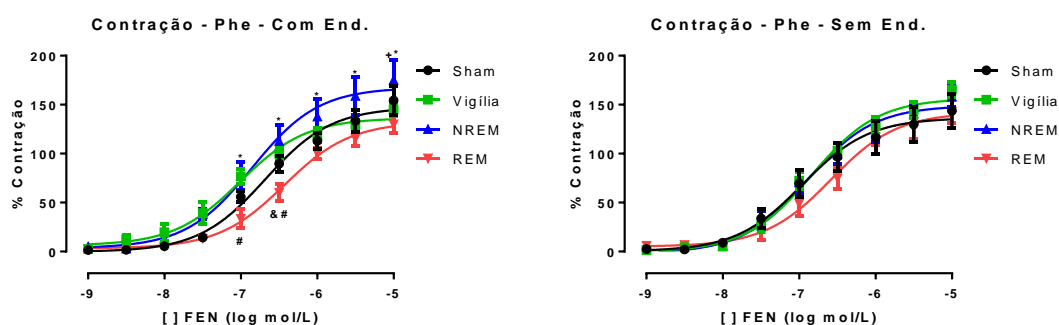


Figura 30 – Análise da porcentagem de contração induzidos por administração de concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina em anéis de aorta com (A) e sem (B) endotélio. Resultados expressos em média \pm EPM. * NREM x REM; + NREM x Vigília; # REM x Vigília; & REM x Sham. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Sidak, $p < 0,05$, $n = 3$.

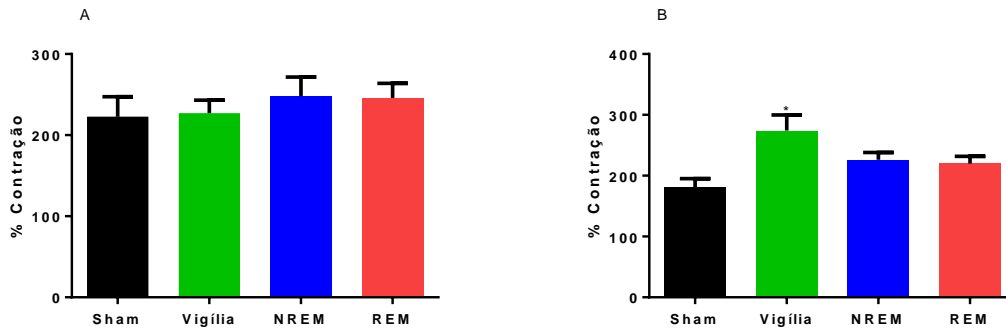


Figura 31 – Análise da porcentagem de contração induzida por KCl 120 mM em anéis de aorta com (A) e sem (B) endotélio. Resultados expressos em média \pm EPM. * Vigília x Sham. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, $n = 3$.

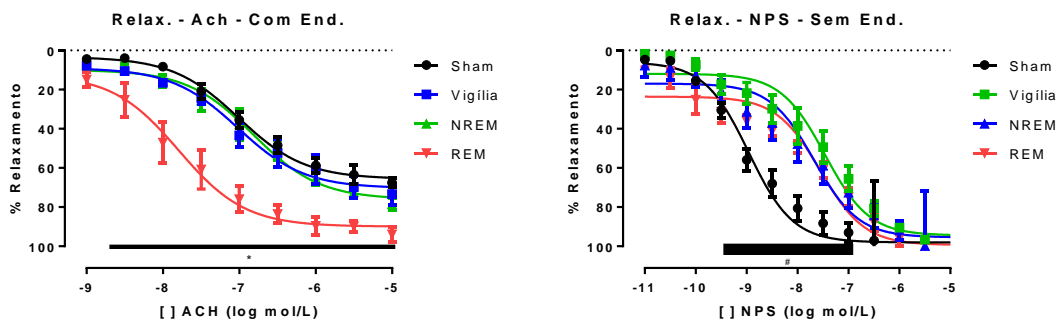


Figura 32 – Análise da porcentagem de relaxamento induzidos por administração de concentrações crescentes e cumulativas de Ach, em anéis de aorta com endotélio (A), e de NPS (B). Resultados expressos em média \pm EPM. * REM x Sham, Vigília e NREM; # Sham x Vigília, NREM e REM. One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Sidak, $p < 0,05$, $n = 3$.

5 DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram: (i) quando os ratos são estimulados apenas em sono NREM, o tempo de abrasamento total da amígdala é menor; (ii) No grupo NREM houve maior quantidade de complexos ventriculares prematuros durante o processo de abrasamento; (iii) há uma taquicardia pós-ictal no grupo NREM, quando comparamos com a FC basal (em vigília) desse grupo, em quase todas as fases do abrasamento; (iv) em R5, nota-se uma bradicardia seguida de uma taquicardia rebote no período ictal, similar em todos os grupos; (v) a latência para o pico máximo de FC no período ictal é menor, durante crises generalizadas, no grupo REM; (vi) a duração da PGES, em crises generalizadas, é maior no grupo REM; (vii) durante a PGES há uma diminuição na FC, apenas no grupo vigília; (viii) no grupo NREM, a porcentagem de contração induzida por fenilefrina foi maior que nos grupos REM e Vigília; quando abrasados em vigília, a porcentagem de contração induzida por KCl 120 mM dos anéis aórticos sem endotélio é maior; (vix) quando na presença de endotélio, o grupo abrasado em REM possui uma maior porcentagem de relaxamento vascular comparado com os demais grupos; (x) quando na ausência de endotélio, todos os grupos abrasados necessitam de concentrações mais altas de NPS para o início do relaxamento quando comparados com o grupo Sham.

Muitas pesquisas estão sendo feitas a fim de esclarecer melhor a relação entre a epilepsia e o sono. Existe, inclusive, um tipo de epilepsia denominada “Epilepsia do lobo frontal noturna” (ELFN), em que crises epiléticas ocorrem exclusivamente durante a noite. Nesse caso, as crises epiléticas vêm acompanhadas de vocalização, automatismos e alterações posturais que, muitas vezes, são confundidos com sonambulismo (81,82).

De fato, a epilepsia está intimamente relacionada ao sono e um pode influenciar no outro de maneira recíproca. Crespel *et al.* (73) avaliaram a quantidade de vezes que o pacientes com ELT ou epilepsia do lobo frontal (ELF) despertaram durante o sono, bem como o tempo que permaneceram em vigília após esses eventos, mostrando que pacientes com ELT tem uma importante fragmentação do sono, não encontrada em ELF. Um outro aspecto do sono

observado em pacientes com epilepsia é a apneia obstrutiva do sono (AOS) presente em 10,2 % desses pacientes (73). Episódios de apneia ou hipopneia geram despertares e, uma vez que alterações na arquitetura do sono e a privação do mesmo aumentam a susceptibilidade a crises epiléticas, a AOS se torna um importante fator de risco para ocorrência de crises (83,84).

No mesmo sentido o sono NREM aumenta a susceptibilidade a crises epiléticas e a principal causa sugerida está relacionada com o alto nível de sincronização neuronal que ocorre nessa fase do ciclo sono-vigília (66). Quando neurônios pós-sinápticos são ativados de forma sincronizada, seja por mecanismos inibitórios ou excitatórios, há uma exacerbação das respostas do mesmo. Nesse sentido, em resposta a uma descarga epilética que ocorre em períodos de alta sincronização neuronal, há o surgimento de crises epiléticas (66,81). Por outro lado, o sono REM pode suprimir crises devido a características fisiológicas exclusivas dessa fase, como a quase completa atonia muscular e a não sincronização neuronal (67).

Goddard *et al.* (56), em um trabalho pioneiro do ano de 1969 que estudou o modelo de abrasamento para indução de crises epiléticas, demonstrou que o tempo médio necessário para abrasamento elétrico da amígdala é de cerca de 15 dias. Dessa forma, nossos resultados corroboram com pesquisas prévias (66,81) que estudam a maior susceptibilidade a crises epiléticas durante o sono NREM, uma vez que mostraram que o tempo para abrasamento do grupo NREM foi menor quando comparado com o grupo Vigília.

Apesar de os resultados terem apontado para uma maior susceptibilidade do grupo NREM ao abrasamento elétrico, nenhuma diferença estatística foi encontrada quando foi analisado a duração da pós-descarga (atividade epileptiforme) dos grupos, em nenhum dos estágios do abrasamento, portanto embora a epilepsia se instale mais brevemente não parece ser mais grave. Em 2006, Sinha *et al.* (85), ao analisar o vídeo-EEG de 57 pacientes com epilepsia, observaram que crises epiléticas generalizadas aconteceram, na maioria das vezes, durante o sono. Por outro lado, esse mesmo estudo, da mesma forma que nossos resultados, não observou diferença na duração das crises quando ocorrem em estado de vigília ou sono, independentemente da fase.

Além disso, um estudo retrospectivo realizado em 1999 por Kloster e Engelskjøn (86) constataram que 61 % dos casos de óbito por SUDEP ocorrem durante o sono. Seguindo a mesma linha, Hajek e Buchanan (75) publicaram recentemente uma pesquisa utilizando o modelo de máximo eletrochoque (MES, *maximal electroshock*) para indução de crises convulsivas. Neste modelo, crises tônico-clônicas são induzidas por choques elétricos supralimíares na córnea ou aurícula dos animais, porém o animal não desenvolve epilepsia crônica (87). Eles mostraram que todos os animais com crises induzidas em REM vieram a óbito, ao passo que 67 % com crises em NREM e 50 % com crises em vigília morreram, e que as crises induzidas durante o sono, em geral, foram mais graves que as induzidas em vigília (75).

Hajek e Buchanan (75) utilizaram a linhagem *Lmx1b^{fl/fl/p}* de camundongos em seu estudo. Essa linhagem é fenotipicamente normal, porém não produz serotonina e tem alta taxa de mortalidade no período pós-natal (88). Além disso, possuem uma série de alterações respiratórias, como episódios de apneias prolongadas no início da vida, e reduzida capacidade de ventilação pulmonar na fase adulta (89), somado a debilitada resposta inflamatória e analgésica (90). Todos esses fatores fazem com que essa linhagem seja mais susceptível ao óbito, explicando o fato de, em nosso estudo, não ter ocorrido nenhuma morte após a indução de crises, ao contrário do que ocorre no estudo de Hajek e Buchanan (75).

Outro aspecto interessante é que alguns estudos demonstram que a maior duração de PGES pode ser um fator de risco para SUDEP (49,50). Em 2010, Lhatoo *et al.* (49) fizeram um estudo em pacientes refratários ao medicamento que foram a óbito por SUDEP, comparando com pacientes que não foram. Demonstraram que duração prolongada de PGES, com mais de 50 segundos de supressão pós-ictal, é um fator de risco para SUDEP. Além disso, a PGES tem sido associada a disfunção pulmonar, uma vez que está relacionada com hipóxia e hipercapnia (91). Hajek e Buchanan (75) avaliaram a duração da PGES após crises induzidas nas diferentes fases do ciclo sono-vigília, porém não encontraram diferença significativa quando compararam o grupo NREM com o Vigília. Além disso, encontraram aumento na duração da apneia e diminuição

da frequência respiratória no período pós-ictal no grupo NREM. O grupo REM não foi analisado uma vez que nele não houve sobrevida após as induções. (75).

Aiba e Noebels, em 2015 (92), demonstraram em crises induzidas pela aplicação tópica de 4-aminopiridina no córtex de camundongos houve alterações autonômicas pós-ictais, evidenciadas por bradicardia, assitolia e apnéia, as quais estavam relacionadas à propagação de ondas despolarizantes no tronco encefálico. Além disso, os autores demonstraram que camundongos com mutações nos genes *Kv1.1* e *Scn1a*, ambos modelos de SUDEP, apresentaram um menor limiar para esta onda despolarizante no tronco encefálico, a qual coincidiu com PEGS cortical. Nesse cenário, nossos resultados sugerem um importante papel das crises induzidas em sono REM, uma vez que a duração de PEGS nessa fase foi maior que nas demais fases do ciclo sono-vigília, ainda durante o processo de abrasamento da amígdala, sugerindo maior predisposição à depressão de núcleos envolvidos no controle cardiorrespiratório.

Além da PEGS, a maioria dos estudos acerca da SUDEP a associam com alterações cardiovasculares que comprovadamente ocorrem em pacientes com epilepsia. Estudos prévios mostraram que crises tônico-clônicas generalizadas podem predispor pacientes com epilepsia a alterações cardiovasculares como arritmias e aumento de FC. Isso pode ocorrer pois o foco epiléptico pode se espalhar para núcleos centrais moduladores de parâmetros cardiovasculares ou respiratórios, causando disfunção autonômica e hipoventilação (93). É o caso, por exemplo, da amígdala (94). Embora o foco de estimulação tenha sido esta região, as arritmias encontradas em nosso estudo foram observadas principalmente nos estágios 4 e 5, correspondentes às crises generalizadas, sugerindo que estejam vinculadas à crise e não à estimulação da amígdala.

Alterações na FC em pacientes com epilepsia podem ocorrer tanto no período peri-ictal quanto no inter-ictal. Damasceno *et al.* (95) buscaram avaliar a disfunção cardíaca em ratos Wistar audiogênicos (WAR), modelo no qual os animais são geneticamente predispostos a gerar crises epilépticas, que ocorrem após sinais auditivos manipulados pelo pesquisador. Encontraram que tanto a pressão arterial sistólica quanto a FC nos ratos WAR são mais altas, mesmo em períodos livres de crise, quando comparados com o grupo controle (95). Esta

evidência de alteração autonômica em modelos de epilepsia foi primeiramente descrita por Colugnati *et al.* (38) ao analisar a FC de animais submetidos ao modelo da pilocarpina para indução da epilepsia (38). A Pilocarpina é um agonista muscarínico. Sua administração culmina em uma atividade epiléptica sustentada denominada de *status epilepticus* (SE), que, a longo prazo, causa danos ao tecido cerebral muito próximos aos que ocorrem em pacientes com epilepsia, culminando em crises espontâneas e recorrentes nesses animais, sendo considerado o modelo que mais mimetiza a epilepsia humana (55,96,97). Em seu estudo, Colugnati *et al.* (38) mostraram que os ratos com dois meses de epilepsia crônica apresentaram maior FC de repouso *in vivo* quando comparado com o grupo controle, ao passo que nenhuma diferença, tanto da FC, quanto da função ventricular, foram observadas nas análises *ex vivo*. Desta forma, demonstraram que a elevação da FC de repouso são dependentes da presença da modulação autonômica e não de alterações locais do tecido cardíaco.

Como já mencionado, as redes neuronais atingidas pela hiperexcitabilidade neuronal durante uma crise epiléptica podem estar relacionadas com o controle de funções cardiovasculares. A exemplo disso, temos a amígdala, o hipotálamo e regiões do bulbo que mantêm o balanço autonômico responsável pela manutenção de funções cardíacas. Nesse mesmo sentido, a modulação autonômica simpática e parassimpática em pacientes com epilepsia também se encontra alterada (98,99). Esse desequilíbrio simpato-vagal pode acarretar em disfunções rítmicas da FC, culminando com o aparecimento de arritmias nesses pacientes, principalmente no período ictal, o que pode estar associado à SUDEP.

Na busca de se avaliar alterações da modulação autonômica, a VFC é um parâmetro muito utilizado, pois além de fornecer informações de forma prévia, é um método seguro e não invasivo em pacientes (41). De fato, há uma extensa literatura que aponta para alterações da VFC de pacientes com epilepsia (100). Tomson *et al.* (45) realizaram um estudo em pacientes com ELT e demonstraram uma diminuição do tônus simpático dos mesmos em relação a indivíduos sem epilepsia, que foi constatado à partir da diminuição do SDNN, do LF e da relação LF/HF. Além disso, encontraram que pacientes que faziam uso de

carbamazepina para controle de crises tinham esses parâmetros ainda mais baixos quando comparados com pacientes não tratados, apontando para o papel da terapia medicamentosa em alterações cardiovasculares induzidas pela epilepsia (45). DeGiorgio *et al.* (46) associaram 7 fatores de risco para a SUDEP, dentre eles a diminuição no RMSSD de pacientes com epilepsia o que caracteriza menor modulação vagal. Em contrapartida, um estudo com ratos WAR demonstrou um aumento no SDNN, VLF, LF, HF e na razão LF/HF dos mesmos quando comparados com ratos Wistar normais, demonstrando que há um desequilíbrio autonômico e, logo, não só a redução da modulação vagal, mas também o aumento da modulação simpática são deletérios (101).

Avaliando sempre períodos de vigília ativa dos animais, em nossos resultados não encontramos diferença significativa quando comparamos a FC e a VFC dos animais após o abrasamento elétrico da amígdala com o período basal (antes do início dos estímulos) e nem quando comparado com o grupo Sham em nenhum dos grupos abrasados. Esse resultado sugere que apenas o abrasamento elétrico da amígdala não é suficiente para provocar alterações na FC e na modulação autonômica em animais, demonstrando então a provável importância da frequência de crises epiléticas nessas alterações evidenciadas em outros estudos. Sugere-se ainda que o ciclo sono-vigília não interfere nas alterações provocadas pelo abrasamento elétrico da amígdala na FC e na modulação autonômica de repouso de ratos Wistar.

Outro parâmetro importante a ser avaliado é a FC (38,102). Um estudo avaliou 102 crises epiléticas de 41 pacientes com a doença e observou um aumento na FC logo após as crises convulsivas, tanto nas generalizadas quanto nas não-generalizadas (35). Em 2011, Pansani *et al.* (37) realizaram um estudo em que analisaram as alterações cardiovasculares induzidas por crises epiléticas utilizando o modelo de abrasamento elétrico da amígdala. Encontraram uma taquicardia pós-ictal quando mais de 10 crises epiléticas foram induzidas apenas em vigília de animais Wistar. Em nosso estudo, consideramos a média do último minuto em vigília ativa dos animais como parâmetro de comparação com o período pós-ictal. Isso porque, nos grupos de sono, no momento do estímulo a FC é menor do que o grupo vigília, devido às

condições fisiológicas dessa fase do ciclo circadiano (103,104). Interessantemente, nosso trabalho mostrou que, quando estimulados apenas em sono NREM, a partir do estágio 2 e até o estágio 4 observamos uma taquicardia pós-ictal. Podemos constatar então que, quando abrasado em sono NREM, a taquicardia pós-ictal já observada no estudo anterior começa a se mostrar desde o início do processo, pressupondo que, com o aumento da frequência de crises, a taquicardia pós-ictal pode ser superior em se tratando de crises durante o sono NREM.

Ainda no trabalho de Pansani *et al.* (37), foi encontrada no período ictal de crises generalizadas (estágios 4 e 5 do abrasamento), bradicardia seguida de taquicardia reflexa, que também foi encontrada em nosso trabalho e em todos os grupos abrasados de forma similar. Dessa forma, o padrão da FC durante o período da crise não difere quando o abrasamento é feito em diferentes fases do ciclo sono-vigília. Embora o sono REM tenha maior PGES e esta esteja relacionada à presença de bradicardia (92), a ausência de diferença neste parâmetro em relação ao sono pode ser devido ao pequeno número de animais ou até mesmo sugerir que esteja relacionada ao maior número de crises durante o sono..

De fato, um dos principais mecanismos sugeridos para a SUDEP é a presença de arritmias. Entre os tipos de arritmia que estão mais presentes está a assistolia ou bloqueio sinusal (BS), presente tanto no período ictal quanto no interictal em estudos com pacientes com epilepsia, assim como de bloqueio átrio-ventricular (BAV) (30). Em nosso estudo, observamos a presença de ES, BAV e BS no período ictal de crises estágio 5, de maneira estatisticamente similar, em todos os grupos. Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos, nota-se que no grupo vigília a quantidade de BAV é, em média, menor do que os demais grupos. Isso sugere que, possivelmente, com um número de animais utilizados para os experimentos aumentado, crises generalizadas poderão causar mais BAV quando ocorridas em sono NREM ou REM.

As ES podem ser isoladas, bigeminadas, ou em salva e formam um grupo de arritmias que chamamos de complexos ventriculares prematuros (CVP) sendo as salvas uma forma mais grave deste tipo de arritmia (105). CVPs têm

sido encontrados em modelos experimentais de epilepsia (101,105). Além disso, a alta frequência destes complexos está associada maior susceptibilidade a lesões cardíacas, como na doença isquêmica, em pacientes aparentemente saudáveis ou não (105). Observamos, em nosso estudo, que no grupo NREM tanto no período ictal quanto no inter-ictal e durante todo o processo de abrasamento, a quantidade de ES bigeminadas e em salva é maior quando comparada com os grupos Vigília e REM. Esses resultados sugerem que o abrasamento, quando feito durante o sono NREM, pode predispor os animais a futuros danos cardíacos. Possivelmente, o maior número de crises induzidas nos animais poderá intensificar esses efeitos.

Sob o aspecto da função cardíaca e ventricular, Colugnati *et al.* (38) demonstraram, através da técnica de Langendorff para corações isolados realizada em ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina, que a função cardíaca intrínseca não foi alterada quando comparada com corações de ratos controle. Por outro lado, Fazan *et al.* (101) analisaram a função cardíaca de ratos WAR anestesiados através da relação pressão-volume do ventrículo esquerdo e demonstraram uma diminuição da pressão sistólica, na $dP/dt +$ e $dP/dt -$, além de um aumento do volume sistólico e diastólico final. Esses resultados sugerem ainda mais uma participação autonômica nas alterações cardiovasculares promovidas pela epilepsia, uma vez que *in vivo* há alterações da função cardíaca, porém quando livre de inervação autonômica essas alterações são abolidas.

No mesmo sentido, para avaliar se o abrasamento elétrico da amígdala induzido em diferentes fases do ciclo sono-vigília altera a função cardíaca intrínseca dos animais, nós realizamos experimento de coração isolado através da técnica de Langendorff. Observamos, porém, que não há diferença em nenhum dos parâmetros avaliados quando comparamos todos os grupos. De forma interessante, um dos animais cujo abrasamento foi feito somente durante o sono REM, não resistiu a isquemia promovida pela oclusão da artéria coronária esquerda, perdendo sua função antes mesmo da reperfusão coronariana, o que indica maior sensibilidade à condição isquêmica (79).

Já, em relação à suscetibilidade às arritmias (*ex vivo*), apenas no grupo Sham foram encontradas arritmias com fator superior a 2, segundo critérios estabelecidos por Savergnini *et al.* (79). Esse resultado pode ser interpretado de maneira a ressaltar o papel da modulação autonômica nas arritmias induzidas pelo abrasamento elétrico da amígdala, uma vez que, ao dissecarmos o coração, retiramos a modulação mediada pelo sistema nervoso autônomo. É importante lembrarmos que já mostramos neste trabalho que, *in vivo*, os ratos do grupo NREM apresentaram um maior número de extra-sístoles, principalmente em salvas, quando comparados aos outros grupos mostrando um coração mais arritmico (105).

Também avaliamos reatividade de anéis da artéria aorta. Nossos resultados demonstraram que o grupo abrasado, somente em sono NREM, possui maior porcentagem de contração induzida por fenilefrina dependente de endotélio quando comparado com os demais grupos. Por outro lado, a porcentagem de contração induzida pela solução modificada com 120mM de KCl nos anéis de aorta sem endotélio é maior no grupo que foi abrasado em vigília quando comparado com os demais grupos. A maior concentração de K⁺ no meio extracelular causa despolarização celular independente de ativação de receptores (diferente do que acontece com a administração de fenilefrina, a qual está relacionada à ativação de receptor alfa-1) (106,107). Dessa forma, podemos sugerir que os anéis de aorta do grupo Vigília têm maior susceptibilidade à despolarização celular, levando à maior capacidade de contração deste grupo, independentemente de fatores relacionados ao endotélio.

A capacidade de relaxamento dos anéis aórticos dos animais de cada grupo também foi testada. Encontramos que os anéis do grupo abrasado somente durante o sono REM possuem uma maior capacidade de relaxamento, dependente de endotélio, quando comparado com os demais grupos. Os grupos abrasados em qualquer fase do ciclo sono-vigília, apesar de terem porcentagem de relaxamento final similar ao grupo Sham, precisam de concentrações mais altas de nitroprussiato de sódio para o início do processo de relaxamento. Porém, daquilo que se refere aos testes *in vitro*, vale ressaltar que o número de experimentos viáveis foi pequeno de tal maneira que estes resultados, embora

com significância estatística, precisam de um incremento no número de animais, para que possamos, com mais segurança fazermos assertivas quanto aos mecanismos de ação. Ainda assim, acreditamos serem fortes indícios de que a epilepsia induzida pelo abrasamento elétrico da amígdala, mesmo que com poucas crises, já leve a alguma modificação do controle vascular.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que taquicardia pós-ictal e PGES, podem se alterar já no processo de epileptogênese nos grupos cujo abrasamento elétrico da amígdala foi feito durante o sono NREM e REM dos ratos Wistar. Somado a isso, identificamos que o processo de abrasamento elétrico da amígdala já é suficiente para causar disfunção na reatividade vascular de ratos Wistar, Alterações estas observadas tanto nos estímulos contráteis quanto de relaxamento.

Assim, de forma geral, nossos resultados corroboram a literatura ao mostrar que a epilepsia induzida pelo abrasamento elétrico da amígdala leva a alterações de parâmetros cardíacos durante as crises e ao longo do processo de instalação da epilepsia. Além disso, apontam para diferenças na progressão do processo de abrasamento, bem como da epilepsia quando os estímulos são realizados em diferentes fases do ciclo sono-vigília.

Está claro para nós que adicionais precisam ser realizados para que entendamos quais os mecanismos envolvidos em tais alterações, mas aquilo que foi mostrado nos permite afirmar que o ciclo sono-vigília, nas epilepsias, deve ser observado de maneira mais cuidadosa, pois este parece exercer influência em fatores que a literatura, de forma recorrente, aponta como contribuintes para a SUDEP.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475–82.
2. Bradford HF. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol*. 1995;47(6):477–511.
3. McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* . 1994;14(6):3413–25.
4. Callahan PM, Paris JM, Cunningham KA, Shinnick-gallagher P. Decrease of GABA-immunoreactive neurons in the amygdala after electrical. 1991;555:335–9.
5. Andrade-Valença LPA, Valença MM, Velasco TR, Leite JP. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose Hipocampal. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*. 2006;12(1):31–6.
6. Armstrong. The neuropathology of temporal lobe epilepsy. *J Chem Inf Model*. 2013;53(9):1689–99.
7. Zhong Q, Ren B-X, Tang F-R. Neurogenesis in the Hippocampus of Patients with Temporal Lobe Epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* . 2016;16(2):20.
8. Di Maio R. Neuronal mechanisms of epileptogenesis. *Front Cell Neurosci* . 2014;8(February):29.
9. Banerjee PN, Filippi D, Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy-A review. *Epilepsy Res*. 2009;85(1):31–45.
10. Burneo JG, Tellez-Zenteno J, Wiebe S. Understanding the burden of epilepsy in Latin America: A systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Res*. 2005;66(1-3):63–74.
11. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and

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

12. Fisher, J. Helen Cross, Jacqueline A. French, Norimichi Higurashi, Edouard Hirsch, Floor E. Jansen, Lieven Lagae, Solomon L. Moshé, Jukka Peltola, Eliane Roulet Perez, Ingrid E. Scheffer SMZ. Operational Classification of Seizure Types by the International League Against Epilepsy. *Int Leag Against Epilepsy*. 2016;

13. Blume WT, Lüders HO, Mizrahi E, Tassinari C, Van Emde Boas W, Engel J. J. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: Report of the ILAE Task Force on classification and terminology. *Epilepsia*. 2001;42(9):1212–8.

14. Scheffer IE, French J, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshé SL, et al. Classification of the epilepsies: New concepts for discussion and debate. Special Report of the ILAE Classification Task Force of the Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia Open*. 2016;1–8.

15. Berg AT, Scheffer IE. New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia*. 2011;52(6):1058–62.

16. D'Adamo MC, Catacuzzeno L, Di Giovanni G, Franciolini F, Pessia M. K(+) channelepsy: progress in the neurobiology of potassium channels and epilepsy. *Front Cell Neurosci*. 2013;7(September):134.

17. Scheffer IE, Berkovic SF, Capovilla G, Connolly MB, Guilhoto L, Hirsch E, Moshe SL, Nordli D, Zhang Y ZS. The Organization of the Epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology Ingrid. *J Chem Inf Model*. 2013;53(9):1689–99.

18. Hauser W a, Kurland LT. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 through 1967. *Epilepsia*. 1975;16(1):1–66.

19. Téllez-Zenteno JF, Hernández-Ronquillo L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Trea*. 2012;2012:630853.

20. Tatum WO. Mesial temporal lobe epilepsy. *J Clin Neurophysiol*.

2012;29(5):356–65.

21. Bercovici E, Kumar BS, Mirsattari SM. Neocortical Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Res Treat*. 2012;2012(5):1–15.

22. El Bahh B, Lespinet V, Lurton D, Coussemacq M, Le Gal La Salle G, Rougier A. Correlations between granule cell dispersion, mossy fiber sprouting, and hippocampal cell loss in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 1999;40(10):1393–401.

23. Stafstrom CE. Back to Basics: The Pathophysiology of Epileptic Seizures: A Primer For Pediatricians. *Pediatr Rev*. 1998;19(10):342–51.

24. Iyer A, Marson A. Pharmacotherapy of focal epilepsy. *Expert Opin Pharmacother*. 2014;15(11):1543–51.

25. Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet*. 2006;367(9516):1087–100.

26. Scorza FA, Arida RM, Terra VC, Cavalheiro EA. What can be done to reduce the risk of SUDEP? *Epilepsy Behav*. 2010;18(3):137–8.

27. Thurman DJ, Hesdorffer DC, French JA. Sudden unexpected death in epilepsy: Assessing the public health burden. *Epilepsia*. 2014;55(10):1479–85.

28. Nashef L. Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions. Vol. 38, *Epilepsia*. 1997. p. S6–8.

29. Kothare S V., Singh K. Cardiorespiratory abnormalities during epileptic seizures. *Sleep Med*. 2014;15(12):1433–9.

30. Van Der Lende M, Surges R, Sander JW, Thijs RD, Sander L. Cardiac arrhythmias during or after epileptic seizures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87:69–74.

31. Massey C a, Sowers LP, Dlouhy BJ, Richerson GB. Mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy: the pathway to prevention. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(5):271–82.

32. Stöllberger C, Finsterer J. Cardiorespiratory findings in sudden unexplained/unexpected death in epilepsy (SUDEP). *Epilepsy Res.* 2004;59(1):51–60.
33. Hesdorffer DC, Tomson T, Benn E, Sander JW, Nilsson L, Langan Y, et al. Combined analysis of risk factors for SUDEP. *Epilepsia.* 2011;52(6):1150–9.
34. Devinsky O. Effects of Seizures on Autonomic and Cardiovascular Function. *Epilepsy Curr.* 2004;4(2):43–6.
35. Opherk C, Coromilas J, Hirsch LJ. Heart rate and EKG changes in 102 seizures: Analysis of influencing factors. *Epilepsy Res.* 2002;52(2):117–27.
36. Pansani AP, Colugnati DB, Sonoda EYF, Arida RM, Cravo SL, Schoorlemmer GHM, et al. Tachycardias and sudden unexpected death in epilepsy: A gold rush by an experimental route. *Epilepsy Behav.* 2010;19(3):546–7.
37. Pansani AP, Colugnati DB, Schoorlemmer GHM, Sonoda EYF, Cavalheiro EA, Arida RM, et al. Repeated amygdala-kindled seizures induce ictal rebound tachycardia in rats. *Epilepsy Behav.* 2011;22(3):442–9.
38. Colugnati DB, Gomes PAP, Arida RM, de Albuquerque M, Cysneiros RM, Cavalheiro EA, et al. Avaliação de parâmetros cardíacos em animais com epilepsia: Possível causa de morte súbita? *Arq Neuropsiquiatr.* 2005;63(4):1035–41.
39. Xhyheri B, Manfrini O, Mazzolini M, Pizzi C, Bugiardini R. Heart Rate Variability Today. *Prog Cardiovasc Dis.* 2012;55(3):321–31.
40. ChuDuc H, NguyenPhan K, NguyenViet D. A Review of Heart Rate Variability and its Applications. *APCBEE Procedia.* 2013;7:80–5.
41. McCraty R, Shaffer F. Heart rate Variability: new perspectives on physiological Mechanisms, assessment of self-regulatory Capacity, and Health risk. *Glob Adv Heal Med.* 2015;4(1):45–61.
42. Camm AJ, Malik M, Bigger JT, Breithardt G, Cerutti S, Cohen RJ, et al.

Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation*. 1996;93(5):1043–65.

43. Cysarz D, Van Leeuwen P, Edelhäuser F, Montano N, Somers VK, Porta A. Symbolic transformations of heart rate variability preserve information about cardiac autonomic control. *Physiol Meas*. 2015;36(4):643–57.

44. Porta A, Faes L, Masé M, D’Addio G, Pinna GD, Maestri R, et al. An integrated approach based on uniform quantization for the evaluation of complexity of short-term heart period variability: Application to 24 h Holter recordings in healthy and heart failure humans. *Chaos*. 2007;17(1).

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

46. DeGiorgio CM, Miller P, Meymandi S, Chin A, Epps J, Gordon S, et al. RMSSD, a measure of vagus-mediated heart rate variability, is associated with risk factors for SUDEP: The SUDEP-7 Inventory. *Epilepsy Behav* . 2010;19(1):78–81.

47. Romigi A, Albanese M, Placidi F, Izzi F, Mercuri NB, Marchi A, et al. Heart rate variability in untreated newly diagnosed temporal lobe epilepsy: Evidence for ictal sympathetic dysregulation. *Epilepsia*. 2016;57(3):418–26.

48. Moseley BD, DeGiorgio CM. The SUDEP Risk Inventory: Association with postictal generalized EEG suppression. *Epilepsy Res*. 2015;117:82–4.

49. Lhatoo SD, Faulkner HJ, Dembny K, Trippick K, Johnson C, Bird JM. An electroclinical case-control study of sudden unexpected death in epilepsy. *Ann Neurol*. 2010;68(6):787–96.

50. Rajakulendran S, Nashef L. Postictal generalized EEG suppression and SUDEP: a review. *J Clin Neurophysiol*. 2015;32(1):14–20.

51. Kuo J, Zhao W, Li CS, Kennedy JD, Seyal MC. Postictal immobility and generalized EEG suppression are associated with the severity of respiratory dysfunction. *Epilepsia*. 2016;57(3):412–7.

52. Seyal M, Bateman LM, Li CS. Impact of periictal interventions on respiratory dysfunction, postictal EEG suppression, and postictal immobility. *Epilepsia*. 2013;54(2):377–82.
53. Kandratavicius L, Alves Balista P, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, et al. Animal models of epilepsy: Use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014;10:1693–705.
54. Löscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 2002;50(1-2):105–23.
55. Priel MR, Dos Santos NF, Cavalheiro EA. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res*. 1996;26(1):115–21.
56. Goddard G V, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol*. 1969;25(3):295–330.
57. Goddard G V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature*. 1967;214:1020–1.
58. Löscher W, Schmidt D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res*. 1988;2(3):145–81.
59. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972;32:269–79.
60. Racine R, Okujava V, Chipashvili S. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972;32:295–9.
61. Racine R, Okujava V, Chipashvili S. Modification of seizure activity by electrical stimulation. III. Mechanisms. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972;32:295–9.

62. Louis RP, Lee J, Stephenson R. Design and validation of a computer-based sleep-scoring algorithm. *J Neurosci Methods*. 2004;133(1-2):71–80.
63. Sciences B. Phases and States of Sleep in the Rat '. 1970;1057–62.
64. Pedemonte M, Rodriguez A, Velluti RA. Hippocampal theta waves as an electrocardiogram rhythm timer in paradoxical sleep. *Neurosci Lett*. 1999;276(1):5–8.
65. McCarley RW. Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Med*. 2007;8(4):302–30.
66. Shouse MN, Farber PR, Staba RJ. Physiological basis: How NREM sleep components can promote and REM sleep components can suppress seizure discharge propagation. *Clin Neurophysiol*. 2000;111(SUPPL. 2):9–18.
67. Kumar P, Raju TR. Seizure susceptibility decreases with enhancement of rapid eye movement sleep. *Brain Res*. 2001;922(2):299–304.
68. Frauscher B, von Ellenrieder N, Ferrari-Marinho T, Avoli M, Dubeau F, Gotman J. Facilitation of epileptic activity during sleep is mediated by high amplitude slow waves. *Brain*. 2015;138:1629–41.
69. Del Felice A, Storti SF, Manganotti P. Sleep affects cortical source modularity in temporal lobe epilepsy: A high-density EEG study. *Clin Neurophysiol*. 2015;126(9):1677–83.
70. Díaz-Negrillo A. Influence of sleep and sleep deprivation on ictal and interictal epileptiform activity. *Epilepsy Res Treat*. 2013;2013:492524.
71. Matos G, Tsai R, Baldo MV, de Castro I, Sameshima K, Valle AC. The sleep-wake cycle in adult rats following pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2010;17(3):324–31.
72. Yi P-L, Tsai C-H, Lin J-G, Lee C-C, Chang F-C. Kindling stimuli delivered at different times in the sleep-wake cycle. *Sleep*. 2004;27(2):203–12.
73. Crespel A, Coubes P, Baldy-Moulinier M. Sleep influence on seizures and

epilepsy effects on sleep in partial frontal and temporal lobe epilepsies. *Clin Neurophysiol.* 2000;111(SUPPL. 2):54–9.

74. Nobili L, Proserpio P, Rubboli G, Montano N, Didato G, Tassinari CA. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) and sleep. *Sleep Med Rev.* 2011;15(4):237–46.

75. Hajek MA, Buchanan GF. Influence of vigilance state on physiologic consequences of seizures and seizure-induced death in mice. *J Neurophysiol.* 2016;(319):jn.00011.2016.

76. Scorza FA, Duncan S, Cavalheiro EA, Scorza CA, Tufik S, Andersen ML. Sleep tight, wake up bright. Should sleep deprivation be included as a potential risk factor for SUDEP? *Epilepsy Behav.* 2014;33:75–6.

77. Buchanan GF, Murray NM, Hajek MA, Richerson GB. Serotonin neurones have anti-convulsant effects and reduce seizure-induced mortality. *J Physiol.* 2014;592(Pt 19):4395–410.

78. Chorro FJ, Such-Belenguer L, López-Merino V. [Animal models of cardiovascular disease]. *Rev española Cardiol.* 2009;62(1):69–84.

79. Savergnini SQ, Beiman M, Lautner RQ, De Paula-Carvalho V, Allahdadi K, Pessoa DC, et al. Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the mas receptor. *Hypertension.* 2010;56(1):112–20.

80. Yildiz O, Seyrek M, Gul H. Pharmacology of Arterial Grafts for Coronary Artery Bypass Surgery. *Ann Thorac Surg.* 2013;251–76.

81. Derry CDS. Sleep and epilepsy. *Epilepsia.* 1985;26(SUPPL. 1):S15–30.

82. Provini F, Plazzi G, Tinuper P, Vandi S, Lugaresi E, Montagna P. Nocturnal frontal lobe epilepsy: A clinical and polygraphic overview of 100 consecutive cases. *Brain.* 1999;122(6):1017–31.

83. Foldvary-Schaefer N, Andrews ND, Pornsriniyom D, Moul DE, Sun Z, Bena J. Sleep apnea and epilepsy: Who's at risk? *Epilepsy Behav.*

2012;25(3):363–7.

84. Matos G, Scorza FA, Mazzotti DR, Guindalini C, Cavalheiro EA, Tufik S, et al. The effects of sleep deprivation on microRNA expression in rats submitted to pilocarpine-induced status epilepticus. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2014;51:159–65.

85. Sinha S, Brady M, Scott CA, Walker MC. Do seizures in patients with refractory epilepsy vary between wakefulness and sleep? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(9):1076–8.

86. Kloster, R.; Engelskjon T. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP): A clinical perspective and a search for risk factors. *J Neurol Neurosyr Psychiatry*. 1999;67:439–44.

87. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. 2011;20(5):359–68.

88. Hodges MR, Wehner M, Aungst J, Smith JC, Richerson GB. Transgenic mice lacking serotonin neurons have severe apnea and high mortality during development. *J Neurosci*. 2009;29(33):10341–9.

89. Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, et al. Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. *J Neurosci* . 2008;28(10):2495–505.

90. Zhao Z-Q, Chiechio S, Sun Y-G, Zhang K-H, Zhao C-S, Scott M, et al. Mice Lacking Central Serotonergic Neurons Show Enhanced Inflammatory Pain and an Impaired Analgesic Response to Antidepressant Drugs. *J Neurosci*. 2007;27(22):6045–53.

91. Seyal M, Hardin KA, Bateman LM. Postictal generalized EEG suppression is linked to seizure-associated respiratory dysfunction but not postictal apnea. *Epilepsia*. 2012;53(5):825–31.

92. Aiba I and NJL. Spreading depolarization in the brainstem mediates

sudden cardiorespiratory arrest in mouse SUDEP models Isamu. 2015;7(282):37–54.

93. Dlouhy BJ, Gehlbach BK, Richerson GB. Sudden unexpected death in epilepsy: basic mechanisms and clinical implications for prevention. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(4):402–13.

94. Leutmezer F, Schernthaner C, Lurger S, P??tzberger K, Baumgartner C. Electrocardiographic changes at the onset of epileptic seizures. *Epilepsia*. 2003;44(3):348–54.

95. Damasceno DD, Savergnini SQ, Gomes ERM, Guatimosim S, Ferreira AJ, Doretto MC, et al. Cardiac dysfunction in rats prone to audiogenic epileptic seizures. *Seizure*. 2013;22(4):259–66.

96. Cavalheiro E, Leite J, Bortolotto Z, Turski W, Ikonomidou C, Turski L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. 1991;32(6):778–82.

97. Turski L, Ikonomidou C, Turski W a, Bortolotto Z a, Cavalheiro E a. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*. 1989;3(2):154–71.

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

99. Tolstykh GP, Cavazos JE. Potential mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2013;26(3):410–4.

100. Bermeo-Ovalle AC, Kennedy JD, Schuele SU. Cardiac and autonomic mechanisms contributing to SUDEP. *J Clin Neurophysiol*. 2015;32(1):21–9.

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

102. Lopes MD, Colugnati DB, Lopes AC, Scorza C a, Cavalheiro E a,

Cysneiros RM, et al. Omega-3 fatty acid supplementation reduces resting heart rate of rats with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2013;27(3):504–6.

103. Otsuka K, Kawakami T, Saito H, Watanabe H. REM sleep and bradyarrhythmia episodes in rats. *J Electrocardiol.* 1989;22(3):235–40.

104. Vigo DE, Dominguez J, Guinjoan SM, Scaramal M, Ruffa E, Solerno J, et al. Nonlinear analysis of heart rate variability within independent frequency components during the sleep-wake cycle. *Aut Neurosci .* 2010;154(1-2):84–8.

105. Pansani AP, Sonoda EY, Scorza FA, Colugnati DB. Premature ventricular complexes: How benign are they in epilepsy? *Epilepsy Behav.* 2015;52:74–5.

106. Baptista V. Starting physiology: bioelectrogenesis. *Adv Physiol Educ .* 2015;39(4):397–404.

107. Takayanagi I, Harada M, Koike K, Satoh M. Differences in $\alpha 1$ -adrenoceptor mechanisms for phenylephrine and tizanidine in rabbit thoracic aorta and common iliac artery. *Can J Physiol Pharmacol [Internet].* 1991;69(12):1819–24.