



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

AVALIAÇÃO REATIVIDADE AÓRTICA, FUNÇÃO VENTRICULAR E
SUSCETIBILIDADE A ARRITMIAS CARDÍACAS DE RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE INDUÇÃO DE EPILEPSIA PELA PILOCARPINA

MARIELLY DA SILVA

GOIÂNIA
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) 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 9.610/98](#), 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.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Marielly da Silva

3. Título do trabalho

Avaliação reatividade aórtica, função ventricular e suscetibilidade a arritmias cardíacas de ratos submetidos ao modelo de indução de epilepsia pela Pilocarpina

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado 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.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por Diego Basile Colugnati, Professor do Magistério Superior, em 11/01/2024, às 10:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Marielly da Silva, Usuário Externo, em 29/01/2024, às 13:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_o rgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 4310097 e o código CRC C65E80D1.

MARIELLY DA SILVA

**AVALIAÇÃO REATIVIDADE AÓRTICA, FUNÇÃO VENTRICULAR E
SUSCETIBILIDADE A ARRITMIAS CARDÍACAS DE RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE INDUÇÃO DE EPILEPSIA PELA
PILOCARPINA**

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

Área de Concentração: em Fisiologia e Órgãos de Sistemas

Orientador: Prof. Dr. Diego Basile Colugnati

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro

GOIÂNIA-GO

2015

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

Silva, Marielly da

Avaliação reatividade aórtica, função ventricular e suscetibilidade a arritmias cardíacas de ratos submetidos ao modelo de indução de epilepsia pela pilocarpina [manuscrito] / Marielly da Silva. - 2015. vii, 54 f.

Orientador: Prof. Dr. Diego Basile Colugnati; co-orientador Dr. Carlos Henrique Castro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiânia, 2015.

Bibliografia.

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

1. Epilepsia. 2. Morte súbita nas epilepsias. 3. Modelo de epilepsia pela pilocarpina. 4. Canais de K-ATP. I. Colugnati, Diego Basile, orient. II. 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 1

1
2 Aos vinte e cinco dias do mês de junho do ano de dois mil e quinze, às nove
3 horas, no Anfiteatro do ICB2 da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os
4 componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Diego Basile Colugnati, Prof.
5 Dr. Fulvio Alexandre Scorza e Profa. Dra. Aline Priscila Pansani para, em
6 sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à
7 avaliação da defesa de dissertação intitulada "Avaliação reatividade aórtica,
8 função ventricular e suscetibilidade a arritmias cardíacas de ratos submetidos
9 ao modelo de indução de epilepsia pela Pilocarpina", em nível de mestrado,
10 área de concentração em Fisiologia e Órgãos de Sistemas, de autoria de
11 **Marielly da Silva**, discente do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em
12 Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta
13 pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A
14 palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em cerca
15 de 32 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a
16 apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado
17 o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à
18 avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução
19 nº1129 de maio de 2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura
20 (CEPEC), que regulamenta o Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em
21 Ciências Fisiológicas, a dissertação foi Aprovada, considerando-
22 se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de
23 Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Goiás. A
24 conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da
25 dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas
26 pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa.
27 Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 horas e 02 minutos,
28 encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Renato César Rodrigues,

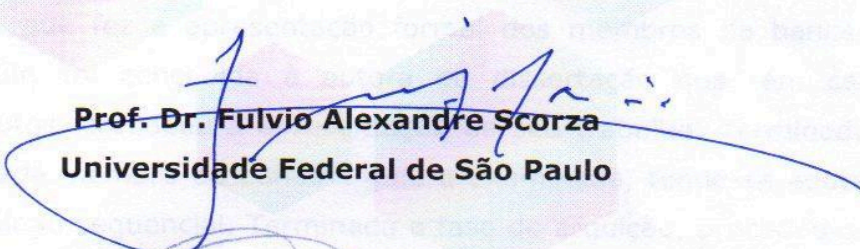


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
29 Assistente em Administração da Secretaria de Pós-graduação do Instituto de
30 Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente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

33
34
35
36
37 
38 **Prof. Dr. Diego Basile Colugnati**

Presidente da Banca

Universidade Federal de Goiás

39
40
41
42
43
44 
45 **Prof. Dr. Fulvio Alexandre Scorza**
46 **Universidade Federal de São Paulo**

47
48
49 
50 **Profa. Dra. Aline Priscila Pansani**

Universidade Federal de Goiás
51

“A Quando o SENHOR trouxe do cativeiro os que voltaram a Sião, estávamos como os que sonham. Então a nossa boca se encheu de riso e a nossa língua de cântico; então se dizia entre os gentios: Grandes coisas fez o Senhor a estes. Grandes coisas fez o Senhor por nós, pelas quais estamos alegres. Traze-nos outra vez, ó Senhor, do cativeiro, como as correntes das águas no sul. Os que semeiam em lágrimas segarão com alegria. Aquele que leva a preciosa semente, andando e chorando, voltará, sem dúvida, com alegria, trazendo consigo os seus molhos.”

Dedicatória

À Deus,

Por ter me dado o fôlego de vida, por ser minha razão de viver. Meu fiel amigo, companheiro nas grandes batalhas que tenho atravessado ao longo da vida. Te agradeço pela sabedoria, persistência, força de vontade, esforço que o senhor tem me presenteado. Ao senhor dedico todas as minhas vitórias, porque sem a tua presença, fidelidade e graça e amor jamais teria chegado até aqui.

A minha mãe

A minha querida e adorada mãe, mulher guerreira ao qual me orgulho. Depois de Jesus Cristo ela é o meu segundo espelho. Por muitas vezes ela deixou de realizar os seus sonhos para realizar os meus. Eu sou eternamente grata pela educação que a senhora me deu. Obrigada pelo cuidado e carinho que a senhora me deu na minha formação pessoal e intelectual. Apesar de todas as dificuldades que passamos através do amor, dignidade, humildade e respeito, que conquistamos ao lado de Deus mais esta vitória.

Agradecimentos

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela oportunidade de realizar esse estudo, oferecendo todo suporte necessário.

Ao meu orientador, Professor Dr. Diego Basile Colugnati, pela brilhante orientação e ensino que me proporcionou durante esses anos, fundamentais à minha formação acadêmica e profissional.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Carlos Henrique de Castro, por sempre estar disposto a ajudar, obrigada pelo aprendizado e suporte na parte experimental.

A Professora Dr. Aline Priscila Pansani pelas orientações e incentivo na realização do estudo.

A Professora Dr. Elizabeth Pereira Mendes, pelas orientações paralelas, incentivo e suporte nos experimentos realizados no Laboratório de Fisiologia de Órgãos Isolados.

Ao coordenador do programa Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Professor Dr Gustavo Rodrigues Pedrino, pela oportunidade de regressar neste programa e oferecendo a todos os alunos suporte necessário para realização dos estudos e pesquisa.

Aos professores Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos e o professor Dr. Manoel Francisco Biancardi pelo incentivo e suporte nos experimentos realizados no laboratório de Histofisiologia.

A colega de laboratório Karina pelo auxílio com os experimentos de vaso isolado e Western Blot respectivamente.

Aos colegas Allancer, Elisângela e Pedro pelo auxílio com os experimentos de coração isolado e histologia.

A todos os professores e colegas de laboratório do Núcleo Integrado de Neurociência e Fisiologia Cardiovascular/UFG, sem os quais não haveria trabalho em equipe e ampliação de conhecimento sobre Fisiologia.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| Dedicatória | iii |
| Agradecimentos | iv |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | vi |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABELAS E QUADRO | x |
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | xii |
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 Epilepsia | 13 |
| 1.2 Tipos de epilepsias | 14 |
| 1.3 Epilepsia do lobo temporal | 16 |
| 1.4 Modelo experimental de epilepsia induzido por pilocarpina | 18 |
| 1.5 Morte súbita em epilepsia (SUDEP) | 20 |
| 1.6 Alterações cardiovasculares e SUDEP | 21 |
| 2 OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 Objetivo geral | 24 |
| 2.2 Objetivos específicos | 24 |
| 3 METODOLOGIA | 25 |
| 3.1 Animais | 25 |
| 3.2. Indução do modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina | 25 |
| 3.3 Grupos experimentais | 25 |
| 3.4 Monitoramento das crises | 25 |
| 3.5 Preparação dos corações isolados | 26 |
| 3.6 Protocolo para coração isolado | 28 |
| 3.7 Preparação dos anéis de aorta isolados | 28 |
| 3.8. Análise Morfométrica | 30 |
| 3.9 Processamento histológico e análise citoquímica | 30 |
| 3.10. Análise Western Blot do coração | 30 |
| 3.11 Índice de gravidade das arritmias(ASI) | 31 |
| 3.12. Análise estatística | 32 |
| 4 RESULTADOS | 33 |
| 4.1. Função cardíaca (<i>ex vivo</i>) | 33 |
| 4.2. Alterações histológicas | 35 |
| 4.3. Expressão de KIR 6.1 e KIR 6.2 | 37 |
| 4.4. Efeito do modelo de epilepsia pela pilocarpina sobre a reatividade aórtica | 37 |
| 5 DISCUSSÃO | 39 |
| 6 CONCLUSÃO | 47 |
| REFERÊNCIAS | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl, microlitros

ACh, Acetilcolina

ADP, Difosfato de adenosina

ATP, Trifosfato de adenosina

ASI (Índice de severidade das arritmias)

BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato)

CA1, Corno de Amon

CA2, Corno de Amon

CA3, Corno de Amon

Ca²⁺, Cálcio

CO₂, Dióxido de carbono

DM2, Diabetes Mellitus tipo 2

dP/dt Máxima, velocidade de contração intraventricular

dP/dt Mínima, velocidade de relaxamento intraventricular

ECG, Eletrocardiograma

EEG, Eletroencefalograma

EH, Esclerose hipocampal

ELT, Epilepsia do lobo temporal

ELTM, Epilepsia do lobo temporal mesial

ERO, Espécie reativa de oxigênio

FC, Frequência cardíaca

g, Gramas

GABA, ácido γ-amino-butírico

GAPDH, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

ILAE, International League against Epilepsy (Liga Internacional contra as epilepsias)

K⁺, Potássio

KCL, Cloreto de potássio

K-ATP, Canais de potássio dependentes de ATP

KIR 6.1, Subunidade dos canais K-ATP

KIR 6.2, Subunidade dos canais K-ATP

KH_2PO_4 , Fosfato monobásico

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sulfato de magnésio

NaCl , Cloreto de sódio

NaHCO_3 , Bicarbonato de sódio

NBT, Nitro azul de tetrazol

O_2 , Oxigênio

PBS, tampão fosfato-salino

PID, Pressão intraventricular diastólica

PIS, Pressão intraventricular Sistólica

PIV, Pressão intraventricular

PDVE, Pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo

PHE, Fenilefrina

PKC, Proteína quinase C

PTPM, Poro de transição da permeabilidade mitocondrial

QT, O intervalo QT é medido do início do QRS ao fim da onda T

RNA, Ácido ribonucléico

SDS, dodecil sulfato de sódio

ST, Segmento ST, que vai do final do complexo QRS até a onda T do ECG

SUDEP, Morte súbita nas epilepsias

TBS-T, *tampão* Tris-salino com tween

VFC, Variabilidade da Frequência Cardíaca

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Imagem representativa da região Hipocampal.

Figura 2 Imagem: Planta *Pilocarpus jaborandi*.

Figura 3 Imagem: Planta *Pilocarpus microphyllus*.

Figura 4 Imagem: Sala de vídeo monitoramento.

Figura 5 Sistema de Langerdorff Pressão Constante.

Figura 6 Registro do experimento Pressão Constante (isquemia).

Figura 7 Registro do experimento Pressão Constante (reperfusão).

Figura.8.Esquema do protocolo experimental do método de Langerdorff (isquemia/reperfusão).

Figura 9 Diagrama esquemático da montagem do anel de aorta isolado em banho de órgãos.

Figura 10 Variação média, a cada 5 minutos, da PIS (A), PID (B), Fluxo Coronariano (C), dp/dt máxima (D), dp/dt mínima (E) e FC (F) durante e após a ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda.

Figura 11 Tempo médio de duração das arritmias (A) e índice de severidade das arritmia (ASI) (B) em corações isolados de ratos submetidos ao modelo de epilepsia pela pilocarpina.

Figura 12 Índice de Massa Ventricular de corações isolados de ratos submetidos ao modelo de epilepsia pela pilocarpina.

Figura 13 Fotomicrografias representativas das amostras de corações de ratos do grupo controle sendo A regiões da lamina sem a presença de vasos sanguíneos e C com vasos sanguíneos; e do grupo epilepsia sendo B regiões da lamina sem a presença de vasos sanguíneos e D.

Figura 14 Valores médios da porcentagem de colágeno em regiões livres de vasos sanguíneos (A) e em regiões com vasos sanguíneos (B) de cortes histológicos de ventrículo dos ratos do grupo controle e grupo epilepsia.

Figura 15 Valores normalizados (pela expressão de GAPDH) da expressão da proteína KIR 6.1 (A) e da proteína KIR 6.2 (B) em amostras de ventrículo esquerdo do coração de ratos do grupo controle e do grupo epilepsia.

Figura 16 Curvas dose-resposta de fenilefrina (10^{-10} - 10^{-6} mol/L) realizadas de forma crescente e acumulativa, tanto em anéis com endotélio funcional (A), quanto em anéis com endotélio removido mecanicamente (B) e Curvas dose-resposta de

Acetilcolina (10^{-10} - 10^{-6} mol/L) foram realizadas de forma crescente e acumulativa, tanto em anéis com endotélio funcional (C), quanto em anéis com endotélio removido mecanicamente (D).

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1- Revisão terminológica para organização das crises epiléticas da ILAE, adaptada de (GUILHOTO, 2011).

Tabela 2- Solução de Krebs Ringer.

Tabela 3- Solução de Krebs-Henseleit.

Tabela 4 Classificação da severidade das arritmias.

Tabela 5 Valores basais expressos em média \pm desvio padrão da média.

RESUMO

O mecanismo de morte súbita nas epilepsias (SUDEP) ainda não está elucidado. Comprometimento da função cardíaca são identificados como o mecanismo provável. Nosso objetivo foi avaliar a função cardiovascular de ratos submetidos ao modelo de epilepsia pela pilocarpina. Materiais e Métodos: Ratos Wistar, pesando 250g no início do experimento foram divididos aleatoriamente em dois grupos iguais: O grupo epilepsia em que os animais foram submetidos a uma injeção de pilocarpina (350 mg / kg ip) precedido (30 minutos) por Metil escopolamina (1 mg / kg ip) e estado de mal epiléptico foi bloqueada após três horas com diazepam (10 mg / kg ip). Monitorização de vídeo (24hs / dia) foi realizada. Os ratos do grupo controle passaram exatamente pelo mesmo procedimento, mas não desenvolveram crises espontâneas ou *status epilepticus*. Ratos quando completaram um mês de epilepsia foram sacrificados e tiveram o coração e aorta torácica dissecados. Foi utilizado o método de Langendorff pressão constante para avaliação da função ventricular e suscetibilidade a arritmias testes induzidos pelo protocolo de isquemia / reperfusão. Para a avaliação da reatividade dos anéis de aorta, foram realizadas curvas de fenilefrina e acetilcolina (10^{-10} - 10^{-6} mol / L). Ao final dos experimentos, os corações foram preparados para análise histológica (Picrossírius) e também biologia molecular (Kir 6.1 e Kir 6.2). Resultados mostraram que os corações de ratos com epilepsia tem piora da função ventricular durante a isquemia em comparação com o grupo controle, mas antes e depois da isquemia não encontrou diferenças significativas. Os anéis de aorta de ratos com epilepsia são menos sensíveis à fenilefrina do que os ratos de controle. Em relação à análise histológica e molecular biológica, a análise dos nossos resultados mostraram que os corações de ratos com epilepsia têm maior deposição de colágeno do que no grupo controle. Conclusão: Nossos resultados apontam para uma piora significativa do tecido cardíaco e da função ventricular em isquemia, o que pode contribuir para SUDEP.

Palavras-Chave: (Epilepsia, morte súbita nas epilepsias, modelo de epilepsia pela pilocarpina, canais de K-ATP)

ABSTRACT

The mechanism of sudden death in epilepsy (SUDEP) is not yet elucidated. Cardiac function impairment is identified as the likely mechanism. Our objective was to evaluate the cardiovascular function of rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. Materials and Methods: Wistar rats weighing 250 g at the beginning of the experiments were randomly divided into two equal groups: The Epilepsy group in which animals were subjected to an injection of pilocarpine (350mg / kg ip) preceded (30 minutes) by Methyl scopolamine (1 mg / kg ip) and status epilepticus was blocked after three hours with diazepam (10 mg / kg ip). Video monitoring (24hs/day) was performed. The control rats went through exactly the same procedure, but did not develop spontaneous seizures or status epilepticus. Rats at one month of epilepsy were sacrificed and had heart and thoracic aorta dissected. Constant Pressure modified langendorff was performed to evaluate ventricular function and arrhythmias tests induced by the protocol of ischemia / reperfusion. For evaluation of the aortic rings reactivity, curves of phenylephrine and acetylcholine (10^{-10} - 10^{-6} mol / L) were performed. At the end of the experiments the hearts were prepared for histological analysis (picrossírius) and also molecular biology (Kir 6.1 and Kir 6.2). Results: showed that the hearts of rats with epilepsy had worsened ventricular function during ischemia compared with the control group, but before and after ischemia did not find significant differences. The aortic rings of rats with epilepsy are less responsive to phenylephrine than control rats. Regarding the histological and molecular biological analyses, our results showed that the hearts of rats with epilepsy have higher collagen deposition than control groups. Conclusion: Our results point to significant worsening of cardiac tissue and the ventricular function at ischemia, which may contribute to SUDEP.

Keywords: (Epilepsy, sudden death in epilepsy, epilepsy model by pilocarpine, K-ATP channels).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

Epilepsia é um distúrbio de origem cerebral, caracterizada por uma predisposição persistente em gerar crises epiléticas, pelas conseqüências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais, estas condições caracterizadas pela ocorrência de pelo menos uma crise epilética (FALCONER; RAJS, 1976).

Existem controvérsias sobre a epilepsia desde os tempos em que seu diagnóstico era associado a situações místicas ou espirituais (DANTAS et al., 2008). Devido ao limitado conhecimento acerca da fisiopatologia dos fenômenos epiléticos, diversos relatos lendários e ideias preconceituosas foram sendo formadas com o passar dos anos (DANTAS et al., 2008).

Durante a Idade Média, mais precisamente no ano de 1484, ocorreram várias perseguições àqueles considerados hereges, esse período ficou conhecido como a Santa Inquisição. Dentre os perseguidos estavam pessoas que apresentavam crises epiléticas (MOREIRA S R G, 2004). No século XVIII foi descrito o primeiro tratado científico sobre a epilepsia, que atribuía à masturbação como causa das crises epiléticas (OLIVEIRA; GOUVEIA, 2003). Entretanto somente no século XIX, que os estudos científicos sobre a epilepsia iniciaram de forma aprofundada (RAMALHO et al., 2009)

Atualmente a epilepsia é a doença cerebral grave mais comum. É um problema universal que afeta todas as faixas etárias, raças, classes sociais e países. Ela impõe enorme fardo físico, psicológico, social e econômico. Apesar de globais esses problemas são maiores nos países em desenvolvimento, onde existe cerca de 80% dos 50 milhões de pessoas com epilepsia no mundo (REYNOLDS, 2002), não havendo diferenças significativas entre os sexos (MARINO JR; ZANETTI, 2004).

Nos países subdesenvolvidos a alta incidência das epilepsias é decorrente da deficiência da assistência maternal e pré-natal, alto índice de prematuridades, desnutrição, lesões causadas durante o parto, crises convulsivas decorrentes de febre durante a infância (SANDER; SHORVON, 1987; SCORZA et al., 2006).

No estudo de Noronha et al. (2007), os resultados sugerem que cerca de um milhão de pessoas são afetadas pela epilepsia no Brasil, em uma população total de

aproximadamente 190 milhões. Sendo que mais de 380 mil pessoas não receberam tratamento adequado. Ocorrendo prevalência maior na classe mais pobre.

Em um estudo realizado em 2009, com objetivo de analisar o número de óbitos por epilepsia no Brasil, no período de 1980 a 2003, foram registrados no total 32.655 óbitos pela epilepsia (LUCENA; FERREIRA, 2009). Sendo que 21.059 óbitos (64,49%) no sexo masculino e 11.575 óbitos (35,45%) no sexo feminino (LUCENA; FERREIRA, 2009).(NORONHA et al., 2007)

1.2 Tipos de epilepsias

A epilepsia é caracterizada por episódios paroxísticos, espontâneos e recorrentes de disfunção cerebral que se expressam através de um grande número de fenômenos sensoriais clínicos, entre eles níveis de consciência alterados, movimentos involuntários, fenômenos sensoriais anormais, alterações autonômicas, e distúrbios transitórios de comportamento (RISS et al., 2008). Podendo ocorrer também de modo espontâneo ou secundário a eventos exógenos, como febre, distúrbios hidroeletrolíticos ou mesmo um quadro encefálico(CASELLA; MÂNGIA, 1999).

No entanto, a crise epiléptica é definida como a manifestação excessiva resultante da atividade epiléptica, usualmente autolimitada de neurônios cerebrais. Porém, quando não é autolimitada são chamadas de crises contínuas e configuram o quadro de *status epilepticus* (YACUBIAN, 2002).

Assim as crises autolimitadas têm tendência a se resolver (GUILHOTO, 2011). Já o quadro de *status epilepticus* (SE)é uma situação de emergência substancial grau de morbidade e mortalidade que requer tratamento imediato e eficaz(YACUBIAN, 2002).OSE, é definido como uma crise duradoura, sem sinais clínicos de interrupção após o tempo habitual das crises na maior parte dos pacientes (YACUBIAN, 2002).Sendo que uma única apreensão clínica pode ser duradoura por mais de 30 minutos ou crises convulsivas repetidas ao longo de um periodo de 30 minutos, sem intervir recuperação do nível de consciência (BROPHY et al., 2012). Recentemente por razões práticas no caso das crises generalizadas tônico-clônicas, SE a definição foi mudada, para crises com duração acima de 5 minutos (BROPHY et al., 2012).

As convulsões são caracterizadas como crises epilépticas associadas a alterações localizadas em áreas posteriores do cérebro, com sintomas visuais, auditivos ou exclusivamente sensitivos(CASELLA; MÂNGIA, 1999).

No relato da comissão da ILAE de 2005-2009, foi revisado conceitos, terminologias e abordagens para classificar crises e formas de epilepsia. Os termos generalizado e focal foram redefinidos; crises que ocorrem em redes neuronais bilateralmente distribuída são classificadas como crises generalizadas; e aquelas que ocorrem dentro de redes delimitadas a um hemisfério ou discretamente localizadas ou mais amplamente distribuídas são crises focais (GUILHOTO, 2011).

As crises generalizadas podem apresentar: crises tônico-clônica, crises de ausências, crises mioclônicas, e perda da consciência. Uma crise tônico-clônica é caracterizada por contração tônica simétrica e bilateral seguida de contração clônica dos quatro membros. As crises de ausências típicas consistem em breves episódios de comprometimento de consciência acompanhados por manifestações motoras muito discretas. Enquanto as crises mioclônicas são contrações musculares súbitas, breves que se assemelham a choques. Já as crises atônicas são caracterizadas por perda do tônus muscular (YACUBIAN, 2002; GUILHOTO, 2011).

As crises focais ou parciais são aquelas em que os achados semiológicos e eletroencefalográficos iniciais sugerem ativação de um grupo de neurônios em uma parte de um hemisfério cerebral. São subdivididas em crises parciais simples (sem comprometimento da consciência), parcial complexa (com comprometimento parcial ou total da consciência) e caracterizada pela presença de automatismo, evoluindo para crises secundariamente generalizadas(DREIFUSS et al., 1981; BERG et al., 2009).

A partir de avanços tecnológicos ao longo dos anos, como o vídeo-eletroencefalograma (EEG), que promoveu melhor conhecimento das manifestações ictais, outras propostas de classificação foram divulgadas pela ILAE, na proposta de revisão de terminologia em 2005-2009 (BERG et al., 2009; GUILHOTO, 2011; SHORVON, 2011), (Tabela 1).

Tabela 1. Revisão terminológica para organização das crises epiléticas da ILAE, adaptada de (GUILHOTO, 2011).

| Novos termos e conceitos | Termos e conceitos antigos |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ● Genética: defeito genético que pode contribuir diretamente para epilepsia e crises como sintomas principais do distúrbio. | <ul style="list-style-type: none"> ● Idiopática: presumivelmente genética |
| <ul style="list-style-type: none"> ● Estrutural/metabólica: causada por distúrbio metabólico cerebral. | <ul style="list-style-type: none"> ● Sintomática: secundária a um distúrbio conhecido ou presumido do cérebro |
| <ul style="list-style-type: none"> ● Desconhecido: a causa é desconhecida e pode ser genética, estrutural ou metabólica. | <ul style="list-style-type: none"> ● Criptogênica: sintomática |
| Terminologia | Termos não mais recomendados |
| <ul style="list-style-type: none"> ● Auto-Limitadas: tendência a resolver espontaneamente com o tempo ● Farmacoresponsiva: provável de ser controlada com medicamentos | <ul style="list-style-type: none"> ● Benigna, catastrófica |
| <ul style="list-style-type: none"> ● Crises focais: semiologia das crises descritas de acordo com características específicas subjetivas (aura), motora, autonômica ou discognitiva | <ul style="list-style-type: none"> ● Parcial Complexa Parcial Simples |

1.3 Epilepsia do lobo temporal

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é responsável por 40% dos casos de epilepsia focal em adultos. Atualmente a ELT foi subdividida em mesial e neocortical ou lateral, de acordo com a origem e semiologia das crises (KANDRATAVICIUS et al., 2007). Sua etiologia foi classificada em familiar e estrutural/metabólica (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006).

A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) corresponde a aproximadamente 60% dos casos de ELT. Ocorrendo principalmente em estruturas límbicas como amígdala, hipocampo, lobo frontal inferior, tálamo medial, neocórtex temporal lateral e córtex entorrinal (SPENCER, 2002). A esclerose hipocampal (EH) é a etiologia encontrada em 50-70% dos pacientes com ELTM refratária ao tratamento clínico (KANDRATAVICIUS et al., 2007). A perda neuronal seletiva no hipocampo é um achado comum na ELT e está associada à gliose da camada granulada do giro denteado, esta condição é comumente denominada esclerose hipocampal (CAVANAGH; MEYER, 1956; LEONI et al., 2012).

A esclerose hipocampal caracteriza-se por uma perda neuronal variável e seletiva em CA1 (Setor de Sommer), CA3 e no hilo. As células granulares do giro denteado e as células piramidais da região CA2 são menos afetadas (GUEDES et al., 2006; LEONI et al., 2012). Regiões representadas na (figura 1). A perda de células hilares do giro denteado, os axônios das células granulares glutamatérgicas, que antes utilizavam essas células como alvo, passam então a fazer sinapses com seus próprios dendritos proximais, criando um circuito monossináptico excitatório, facilitando a reentrada do estímulo excitatório e o aparecimento de crises epiléticas. Portanto, os processos fisiopatológicos responsáveis pela ELT envolvem uma série de fenômenos, incluindo excitotoxicidade, hiperatividade glutamatérgica, aumento da concentração de íons de Ca^{2+} intracelular e reorganização de circuitos neuronais, que estão provavelmente envolvidos na epileptogênese (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2013).

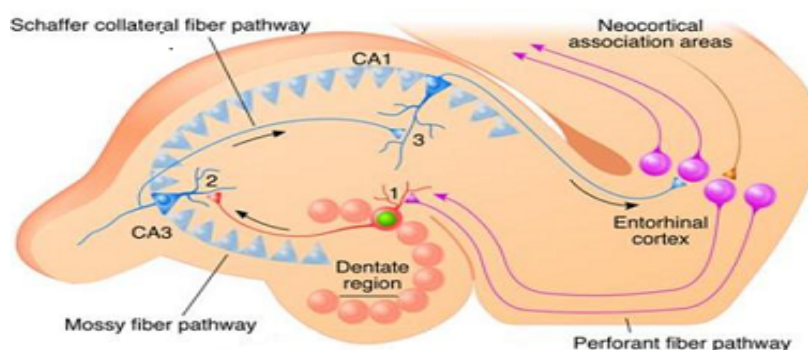


Figura 1. Imagem representativa da região Hipocampal (células piramidais das regiões CA1 e CA2, giro denteado, córtex entorrinal e áreas de associação do neocortical). Fonte: look for diagnosis

O início ELT ocorre na fase da vida adulta, mas as primeiras crises podem ocorrer inicialmente na infância e na adolescência (GUEDES et al., 2006). Em geral, a ELT se caracteriza por crises parciais simples e complexas recorrentes. Crises com generalização secundária (crises tônico-clônicas) ocorrem com menor frequência (SCHLINDWEIN-ZANINI et al., 2008).

Em aproximadamente 30% dos pacientes com epilepsia, serão refratárias ao tratamento com monoterapia. A avaliação e investigação para o tratamento cirúrgico devem ser consideradas (BETTING et al., 2003). A politerapia medicamentosa pode ser indicada com o conhecimento de que uma porcentagem baixa destes pacientes 3% -10% ficaram livres das crises (KWAN et al., 2000).

Na presença de focalidades e congruência entre a semiologia-exame neurológico, EEG e neuro imagens a indicação para o tratamento cirúrgico deve ser sempre considerada no caso de epilepsias refratárias (ENGEL et al., 2003). Um atraso no tratamento cirúrgico em pacientes com indicação pode ser prejudicial (BETTING et al., 2003). Um exemplo disso é a epilepsia de lobo temporal que apresenta uma porcentagem de 60-70% dos adultos com ausência de crises epiléticas após a realização do tratamento cirúrgico (ENGEL et al., 2003).

Outros casos de epilepsia podem ser decorrentes de lesões, como em pacientes com doenças sistêmicas e neoplasias (SCORZA et al., 2006; GOMES, 2010). Além disso alterações na permeabilidade e integridade vascular resultante da encefalopatia hipertensiva podem levar a pequenas áreas de edema e hemorragia, sendo capazes de gerar crises (SCORZA et al., 2006).

1.4 Modelo experimental de epilepsia induzido por pilocarpina

Muitas informações de que a ciência dispõe atualmente sobre a base celular e molecular da epileptogênese foram obtidas a partir de modelos experimentais em animais (GOMES, 2010). O modelo de epilepsia induzida pela pilocarpina tem sido amplamente utilizado em função da facilidade da técnica e, principalmente, pela semelhança fisiopatológica com a epilepsia do lobo temporal humana. Essa droga é um potente agonista muscarínico que promove, em ratos, uma sequência de alterações comportamentais e eletroencefalográficas, que resulta no desenvolvimento da epilepsia (SCORZA et al., 2009).

A pilocarpina é um alcaloide extraído das folhas da *Pilocarpus jaborandi*(Figura 2) e *Pilocarpus microphyllus* (Figura 3), plantas encontradas nas florestas da América do Sul. Ao ministrar este alcaloide, ocorrerá a promoção da ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos do subtipo M1(subtipo mais expresso no hipocampo, presentes nas células piramidais de CA1 e CA3, células granulares e em alguns interneurônios) (TURSKI et al., 1983).O que atualmente é aceito, que o sistema colinérgico pode ser responsável pela ativação inicial de neurônios excitatórios glutamatérgicos, o que iniciaria a atividade convulsiva. O excesso de liberação de glutamato durante o *status epilepticus* poderia manter as células despolarizadas, produzindo liberação contínua de cálcio dos estoques intracelulares, levando a geração de lesões da membrana celular e de outras organelas levando a morte celular por excito toxicidade (SCORZA et al., 2006). Foi demonstrado que a pilocarpina atuando em receptores muscarínicos, gera desequilíbrio entre a transmissão excitatória e inibitória, gerando o quadro de *status epilepticus* (PETROFF et al., 2002).

A pilocarpina além de alterar os níveis do neurotransmissor colinérgico e pode produzir alterações em outros sistemas de neurotransmissores como a noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e ácido γ -amino-butírico (GABA), embora pouco se saiba sobre estas alterações (FREITAS, 2011).

Os efeitos da administração da pilocarpina são caracterizados em três períodos. O período agudo tem de 1 a 2 dias de duração e corresponde ao modelo de convulsões límbicas repetidas e do estado de mal epiléptico. O período silencioso é caracterizado pelo progressivo retorno ao EEG e comportamento normal sem convulsão, compreendendo cerca de 4 a 44 dias, com uma média de 15 dias de duração nos animais. E a terceira fase corresponde ao período das convulsões recorrentes espontâneas. Essa fase começa entre 5 e 45 dias depois da administração da pilocarpina e permanece durante toda a vida do animal(TURSKI et al., 1983; FREITAS, 2011).

Inicia-se as crises espontâneas com automatismo faciais, clonias dos membros anteriores, elevação do corpo com apoio nas patas posteriores e perda do equilíbrio seguida por crises clônicas generalizadas, com duração variada entre 40 a 60 segundos (TURSKI et al., 1983; LEITE et al., 1990). As crises espontâneas tendem a ocorrer no período diurno, com frequência de duas a três vezes por semana, segundo o estudo da avaliação do perfil circadiano (TURSKI et al.,

1983). Logo depois que ocorre a crise convulsiva os animais apresentam sonolência e começam a ter comportamentos agressivo a manipulações. Quando os animais apresentam crises tônicas este comportamento é exacerbado (LEITE et al., 1990).



Figura 2. Imagem: Planta *Pilocarpus jaborandi*. Fonte: (Instituto arqueiro)



Figura 3 Imagem: Planta *Pilocarpus microphyllus*. Fonte: (Instituto arqueiro)

1.5 Morte súbita em epilepsia (SUDEP)

Estima-se que a mortalidade global dos indivíduos acometidos por epilepsia seja duas ou três vezes superior à da população geral. O óbito em indivíduos acometidos por epilepsia pode ser decorrente de inúmeras causas, relacionadas ou não à doença epiléptica (LUCENA; FERREIRA, 2009).

O congresso internacional sobre epilepsia e morte súbita, ocorrido em 1996 em Londres, definiu a morte súbita em epilepsia (SUDEP-Sudden death in epilepsy) como, “*O óbito deve ocorrer de maneira não traumática, sem afogamento, pode ter ou não relatos de crise, excetuando-se status epilepticus e os exames realizados após a morte não podem revelar causas anatômicas ou toxicológicas*” (NASHEF, 1997).

A incidência da SUDEP é considerada alta em pacientes com epilepsia crônica (1-2/1,000 pessoas/ano) e maior nos indivíduos com epilepsia refratários ao tratamento farmacológico (3-9/1,000 pessoas/ano)(STÖLLBERGER; FINSTERER, 2004; SCORZA et al., 2008).

Em um estudo epidemiológico foi avaliado o índice de mortalidade por epilepsia no Brasil, no período de 1980 a 2003. Os dados revelaram redução de 20,35% do coeficiente de mortalidade por epilepsia no Brasil (1,13/100.000 em 1980 a 0,9/100.000 em 2003). A análise da mortalidade, segundo as características epidemiológicas, evidenciou: predominância do sexo masculino; taxas de mortalidade maiores nos grupos etários mais elevados e aumento expressivo da mortalidade na região Nordeste do país,(LUCENA; FERREIRA, 2009).

Existem alguns fatores de risco para a SUDEP como: idade entre 20 a 40 anos, início precoce das epilepsias, tempo de duração das epilepsias, não controle e frequência das crises epiléticas, tipos de crises epiléticas principalmente às relacionadas a crises tônico-clônicas generalizadas, regime de drogas antiepiléticas adotado e temperaturas frias (STÖLLBERGER; FINSTERER, 2004; SCORZA et al., 2007, 2008).

1.6 Alterações cardiovasculares e SUDEP

Compreender os mecanismos dos fenômenos da morte súbita na epilepsia (SUDEP) é essencial(SCORZA et al., 2011). As causas da SUDEP atualmente não estão esclarecidas no entanto, uma possível explicação seria a possibilidade de ter origem cardiogênica (COLUGNATI et al., 2005). Do ponto de vista morfológico, alterações cardiovasculares têm sido demonstradas em pacientes com epilepsia que tiveram morte súbita (SCORZA et al., 2007). Quando realizada necropsia, do tecido cardíaco de pacientes com epilepsia, alterações micro e macroscópicas foram encontradas, o que pode contribuir para a morte súbita. Essas alterações são: dilatação e hipertrofia cardíaca, fibrose nas paredes de pequenas artérias

coronárias, atrofia dos cardiomiócitos, degeneração miofibrilar, infiltração leucocitária que sugere miocardite focal e alterações morfológicas do sistema de condução cardíaco (FALCONER;RAJS,1976;KLOSTER;ENGELSKJØN,1999b).

Arritmias cardíacas e apneia podem ser causa de morte súbita em pacientes com epilepsia. Estruturas mesiais do lobo temporal, especialmente a amígdala e o hipocampo, estão relacionadas com o controle respiratório e autonômico. Sintomas autonômicos frequentemente acompanham crises parciais(NASHEF et al., 1996; JORGE et al., 2000).

No estudo realizado por Li et al., (1995), os autores analisaram o eletrocardiograma (ECG) em 61 crises parciais complexas do lobo temporal de 20 pacientes. Foi observada taquicardia em 39 % dos pacientes e bradicardia em 35% destes, sendo o maior intervalo R-R observado de 9 segundos.

No estudo de Zijlmans et., 2002, foram analisados 281 crises em 81 pacientes. Foi encontrado um aumento na frequência cardíaca de pelo menos 10 batimentos por minutos em 93% dos pacientes, em 80% dos pacientes houve um aumento da frequência cardíaca maior que 20 batimentos por minuto, ao passo que em 7% dos pacientes houve uma redução da frequência cardíaca em mais de 10 batimentos por minutos. A taquicardia precedeu o início clínico e eletrocardiográfico das crises, onde anormalidades no ECG foram encontradas em 44% dos pacientes, mostrando que a taquicardia é a alteração cardíaca mais comum em pacientes com ETL.

Os dados de uma análise dos fatores de risco para a SUDEPE indicam que quanto maior a frequência de crises tônico-clônicas, maior é a chance de ocorrer o óbito(SHORVON, 2011; VARGAS, 2012). Estes riscos também são elevados em pacientes do sexo masculino, pacientes com longa duração das epilepsias, e aqueles em politerapia antiepiléptica(SHORVON, 2011). As crises também podem induzir prolongamento do intervalo QT, especialmente quando há hipercapnia, hipóxia ou hiperatividade simpática (RICHERSON, 2013).

No estudo de Leestma et al., (1984) foram analisados 66 casos de morte súbita em pacientes com epilepsia. A autópsia não foi suficiente para explicar a morte, e não havia nenhuma evidência que envolveria patologia sistêmica. O estudo neuropatológico revelou lesões cerebrais, o que provavelmente ocasionou as crises em 60% dos casos. O mecanismo que poderia ter levado aos óbitos envolve arritmias

cardíacas, provavelmente mediadas por eventos autonômicos simpáticos que poderiam ocorrer durante as crises.(LEESTMA et al., 1984)

Em um estudo transversal, retrospectivo, foram analisados os registros de ECG de 185 pessoas com epilepsia refratária e 178 controles sem epilepsia. Os resultados encontrados mostraram que a frequência cardíaca encontrava-se elevada nos pacientes com epilepsia, o padrão de repolarização precoce (ERP) e o prolongamento grave do segmento QT parecem ser mais prevalentes em pessoas com epilepsia refratária(LAMBERTS et al., 2014).

Na atualidade a epilepsia já é bem elucidada, em especial as epilepsias do lobo temporal. Entretanto existem ainda alguns aspectos a serem esclarecidos a respeito dos mecanismos de epileptogênese. Devido a isso, é de grande importância o uso de modelos experimentais que permitam a realização de procedimentos e intervenções não possíveis de serem realizados em seres humanos. Um exemplo de modelo de epilepsia crônica que se destaca pela sua similaridade com a epilepsia do lobo temporal em humanos é o modelo de epilepsia induzida por pilocarpina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar função cardíaca, suscetibilidade a arritmias e reatividade vascular de ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a função ventricular e a suscetibilidade às arritmias de isquemia / reperfusão do coração dos ratos submetidos ao modelo da pilocarpina (*ex vivo*).
- Avaliar a reatividade da artéria aorta dos ratos submetidos ao modelo da pilocarpina (*ex vivo*).
- Avaliar a integridade do tecido cardíaco dos ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 250 gramas, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

Os animais foram alojados em gaiolas apropriadas, no Laboratório de Manutenção de Animais do Departamento de Ciências Fisiológicas/ICB/UFG, onde tiveram livre acesso à comida e água. As condições deste biotério obedecem a um ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro e temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$).

3.2. Indução do modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina

Para a aquisição de animais com epilepsia foi utilizado o modelo de indução de epilepsia por pilocarpina. Inicialmente todos os animais utilizados neste estudo foram pré-tratados com metil-escopolamina (1mg/Kg) subcutaneamente, trinta minutos antes da injeção de pilocarpina. A pilocarpina foi injetada em dose única (350 mg/Kg) intraperitonealmente. Após essa aplicação foi aguardado o *status epilepticus*. Os animais que entraram no *status epilepticus* receberam diazepam (10 mg/Kg) intraperitonealmente após 3 horas da primeira crise.

3.3 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram divididos em: Grupo Controle e Grupo Epilepsia, todos os animais passaram pelo protocolo experimental de indução de epilepsia pela pilocarpina. Os animais pertencentes ao grupo controle passaram pelo protocolo mas não entraram em *status epilepticus*. Os animais do grupo epilepsia passaram pelo protocolo e entraram em *status epilepticus* e desenvolveram crises espontâneas.

3.4 Monitoramento das crises

Os animais pertencentes ao grupo epilepsia, após o bloqueio do *status epilepticus* foram colocados em gaiolas individualizadas em uma sala de

monitoração por vídeo, onde foram filmados 24 horas por dia desde a indução do modelo, para determinação do início da fase crônica, bem como da frequência de crises (Figura 4).



Figura 4. Sala de vídeo monitoramento. *Fonte: (UFG)*

3.5 Preparação dos corações isolados

Para avaliação da função ventricular e sensibilidade à arritmias, foi utilizada a técnica de Langendorff com Pressão constante com indução de arritmias por isquemia/reperfusão seguindo os mesmos procedimentos de Savergnini et al., (2010). Utilizando um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems, INC Santa Barbara, Califórnia) (Figura 5). Os animais foram eutanasiados por decapitação 15 minutos após serem heparinizados (400 μ l). A cavidade torácica foi aberta e o coração retirado e colocado em um béquer contendo solução nutritora em temperatura aproximada de 4° C. Esse resfriamento foi necessário para diminuir o metabolismo do miocárdio, antes destes serem conectados ao sistema de perfusão.

Após os corações terem sido colocados sobre uma placa de petri, foram removidos os tecidos que acompanharam o coração. A artéria aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação e fixada a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão contendo a solução nutritora de Krebs Ringer (mmol/L). Esta solução de perfusão foi mantida a $37\pm 1^\circ$ C e saturada com solução carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Como descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Solução de Krebs Ringer

| Composto | Concentração em mM |
|---------------------------------------|--------------------|
| NaCl | 118.4 |
| KCl | 4.7 |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 1.2 |
| CaCl ₂ . 2H ₂ O | 1.25 |
| Glicose | 11.7 |
| NaHCO ₃ | 26.5 |

Para a análise dos parâmetros de contratilidade miocárdica, um pequeno balão conectado a um transdutor de pressão foi inserido na câmara ventricular esquerda para registro das pressões intraventricular sistólica (PIS) e diastólica (PID), dP/dt máxima e mínima e Frequência cardíaca (FC). Além deste transdutor, outros três eletrodos foram acoplados ao coração para registro do ECG (Figura 5 e 6).

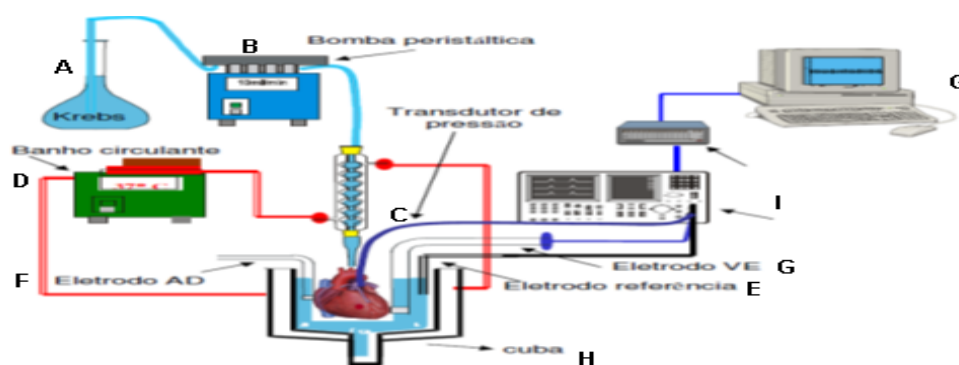


Figura 5. Sistema de Langerdorff Pressão Constante. Em (A) solução de Krebs Ringer, (B) Bomba peristáltica, (C) Transdutor de pressão, (D) Banho circulante, (E) eletrodo referência, (F) Eletrodo no Atrio direito AD, (G) eletrodo no ventrículo esquerdo VE, (H) cuba, (I) amplificadores (J) computador.
Fonte:Revista <http://www.revespcardiol.org>

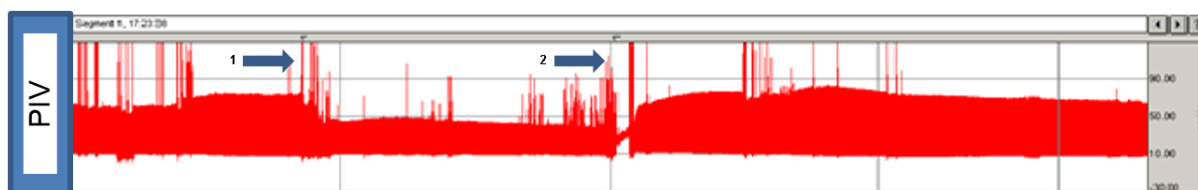


Figura 6. Registro do experimento Pressão Constante (PIV- Pressão intraventricular), início da isquemia (seta 1) e início da reperfusão (seta 2).

3.6 Protocolo para coração isolado

Após um período basal de 20 minutos de estabilização, foi realizada nos corações isolados uma isquemia no ventrículo esquerdo através de uma obstrução na artéria coronariana esquerda descendente anterior, feita com uma linha de seda trançada. O período de isquemia durou 15 minutos. Depois deste período a obstrução foi retirada e o coração passou por um período de reperfusão por mais 30 minutos (Figura 7). Durante todos os períodos do experimento o fluxo coronariano foi coletado e mensurado a cada 5 minutos.

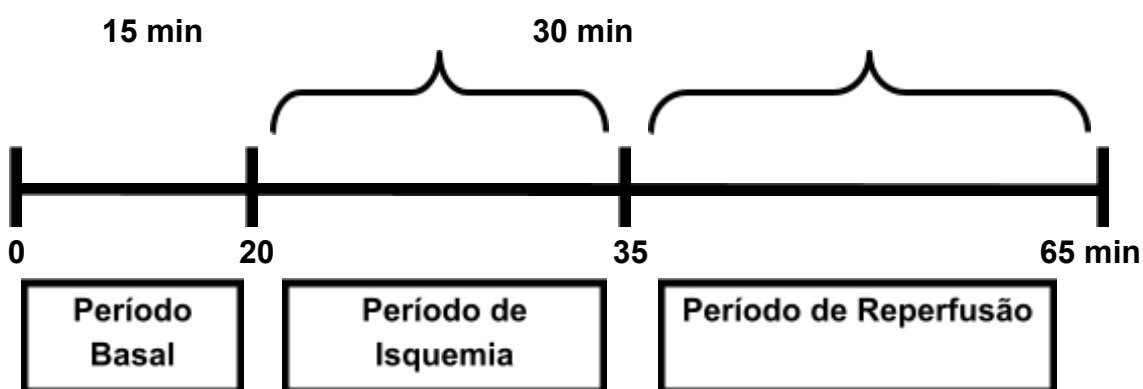


Figura 7. Esquema do protocolo experimental

3.7 Preparação dos anéis de aorta isolados

Para avaliação da reatividade da artéria aorta, anéis de aorta torácica descendente, livre de tecido adiposo e conectivo, foram montados em solução de Krebs-Henseleit (mM) gaseificada (95% de O₂ e 5% CO₂, a 37±1 °C. Composição da solução nutritora detalhada na (Tabela 3).

TABELA 3. Solução de Krebs-Henseleit.

| Composto | Concentração em mM |
|---------------------------------------|--------------------|
| NaCl | 118.06 |
| KCl | 4.6 |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 2.4 |
| CaCl ₂ . 2H ₂ O | 3.3 |
| Glicose | 11.1 |
| NaHCO ₃ | 24.9 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.9 |

Os animais foram eutanasiados por decapitação 15 minutos após serem heparinizados (400µl de heparina). Quando a cavidade torácica estava exposta, aorta torácica descendente foi retirada e dividida em anéis de 4mm.

Os anéis foram mantidos sob uma tensão de 1.5g durante 1 hora para o período de estabilização, sendo que nesse período, a cada 15 minutos a solução do banho foi renovada e a tensão foi ajustada. A atividade mecânica foi registrada isometricamente usando um sistema de aquisição de dados (Dataq Instruments) (Figura 8).

A presença de endotélio funcional foi avaliada pela porcentagem de relaxamento induzido pela acetilcolina 10^{-5} mol/L nos vasos pré-contraídos com fenilefrina 10^{-7} mol/L. Quando se fez necessário, o endotélio vascular foi removido através do atrito mecânico da superfície interna do vaso com uma haste metálica.

Curvas dose-resposta de fenilefrina e acetilcolina (10^{-10} - 10^{-6} mol/L) foram realizadas de forma crescente e acumulativa, tanto em anéis com endotélio funcional, quanto em anéis com endotélio removido mecanicamente para avaliação da reatividade vascular aórtica.

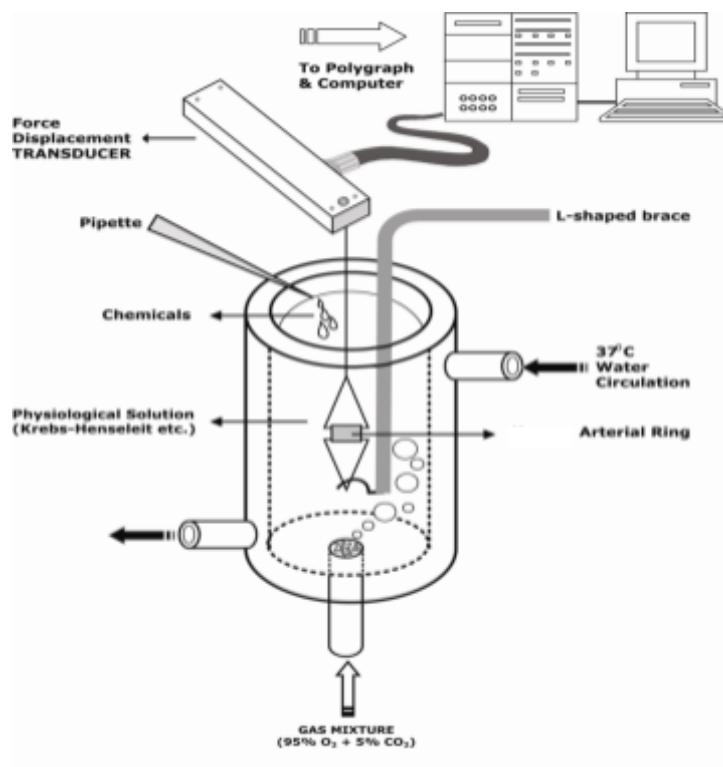


Figura 8. Diagrama esquemático da montagem do anel de aorta isolado em banho de órgãos. Fonte: adaptado de YILDIZ; SEYREK; GUL, 1999.

3.8. Análise Morfométrica

Ao final dos experimentos de coração isolado, os corações foram perfundidos com 2 ml de KCl para que permanecessem em diástole para dissecação do ventrículo esquerdo. O ventrículo esquerdo após ser dissecado foi pesado separadamente. O índice de massa ventricular foi obtido através da massa do ventrículo esquerdo dividida pelo comprimento da tíbia do animal.

3.9 Processamento histológico e análise citoquímica

Após a pesagem o ventrículo esquerdo foi dividido em três partes realizando cortes transversais. As partes medianas do ventrículo esquerdo foram coletadas e fixadas em Paraformaldeído 4% em tampão fosfato por um período de 24 horas. Após a fixação os tecidos foram lavados em água e desidratados em séries crescentes de etanol (Merck®). Posteriormente foram clarificadas em xilol (Merck®) e incluídas em parafina (Paraplast, Sigma). Seguidamente, as amostras foram seccionadas no micrótomo Leica (Leica RM2155, Nussloch, Germany) com uma espessura de 4µm. Após os cortes, os tecidos foram submetidos a coloração com picrossírius para a identificação do tecido fibroso e quantificação do volume de colágeno intersticial. As microfotografias foram obtidas no microscópio Zeiss Scope A1, (aumento de 200X) e as imagens foram digitalizadas no software zen lite 2012 e as medidas dos cardiomiócitos foram realizadas no software Imagem Pro-Plus v6.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA). Descrição dos procedimentos para a realização da citoquímica dos cortes histológicos.

3.10. Análise Western Blot do coração

Os animais do protocolo experimental submetidos a técnica de coração isolado, foram utilizado para as análises por Western Blot Após eutanásia, amostras do ventrículo esquerdo foram coletadas e mantidas em nitrogênio líquido, sendo logo depois estocadas a -80°C. Posteriormente, foram lisadas em Tampão de lise: PBS (tampão fosfato-salino) 1X, 1% Nonidet P40, 0.5% deoxicolato de sódio, 0.1% SDS (dodecil sulfato de sódio), inibidor de protease 0,01%, água q.s.p., sonicadas, e, após incubação em gelo por 30 minutos, foram centrifugadas a 12.000 RPM, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o extrato proteico foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), sendo depois congelado a -80°C.

Posteriormente, o volume de amostras correspondente a 40 µg foi separado em tubo identificado, acrescentando-se 5 µL de tampão de amostra (7 mL de Tris HCl/SDS, 3 mL de glicerol, 1 g de SDS, 0,6 mL de β-mercaptoetanol, 1,2 mg de azul de bromofenol, 10 mL de água q.s.p.) e água mili-Q até completar-se o volume de 30 µL.

As amostras foram fracionadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida nas concentração de 12%, dependendo do peso molecular da proteína de interesse, e corridas a 100 volts por 120 minutos. Posteriormente, foi realizada a transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose também a 100 volts por 120 minutos, a temperatura de 4°C.

Em seguida, a membrana foi corada com Ponceau 0,5%, para a certificação da eficiência da corrida e da transferência, lavada com TBS-T (*tampão* tris-salino com tween) e incubada com leite a 5% por 1 hora, para diminuir a possibilidade de haver futuras ligações inespecíficas com o anticorpo usado para a detecção da proteína alvo. A membrana foi incubada com anticorpo primário de interesse por 24 horas e, posteriormente, com anticorpo secundário comercial conjugado com fosfatase alcalina por 1 hora e trinta minutos. A membrana foi revelada com solução de substrato cromogênico para fosfatase alcalina contendo BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e NBT (nitro azul de tetrazol) (Invitrogen). As bandas foram analisadas pelo software Imagem J e a expressão das proteínas foi mostrada de forma relativa ao grupo controle, ao qual foi atribuído o valor de 1.

As proteínas analisadas por esta técnica e as respectivas concentrações dos anticorpos utilizados foram: KIR 6.1(Santa Cruz) 1:4000, Rabbit anti-goat IgG (Santa Cruz) 1:10000, KIR 6.2 (Santa Cruz) 1:1000, ECL™ anti-mouse IgG (GE Healthcare) 1:2000, GAPDH (Santa Cruz) 1:2000, ECL™ anti-rabbit IgG (GE Healthcare) 1:5000.

3.11 Índice de gravidade das arritmias(ASI)

O Índice de gravidade das arritmias (ASI), é utilizado para obtenção de uma medida quantitativa das arritmias. As arritmias foram graduadas arbitrariamente de acordo com a sua duração. Uma duração de 30minutos é considerada como arritmia irreversível(FERREIRA et al., 2001). Segue na (tabela 4) a classificação da gravidade das arritmias de acordo com a duração do tempo e seus respectivos fatores correspondentes.

Tabela 4: Classificação da severidade das arritmias

| Período de arritmias | Classificação de severidade |
|-----------------------------|------------------------------------|
| 3 minutos | Fator 2 |
| 3-6 minutos | Fator 4 |
| 6-10 minutos | Fator 6 |
| 10-15 minutos | Fator 8 |
| 15-20 minutos | Fator 10 |
| 20-25 minutos | Fator 11 |
| 25-30 minutos | Fator 12 |

3.12. Análise estatística

O software utilizado para a análise dos dados foi o GraphPadPrism 5.0[®]. Para a análise dos resultados obtidos na técnica de coração isolado foram utilizados os testes de análise de variância bifatorial de duas vias (Two-Way ANOVA) seguido do pós teste de Fisher. Para avaliação da reatividade vascular foi feito o teste (Two-Way ANOVA) seguido do pós teste Bonferroni. Para análise dos resultados do tempo médio de duração das arritmias, (ASI), Índice de massa ventricular, valores da morfometria, histologia e normalizados da expressão da proteína KIR 6.1 e KIR 6.2, foi utilizado o teste t – Student. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Todas as análises estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1. Função cardíaca (*ex vivo*)

Os ratos submetidos ao modelo de epilepsia pela pilocarpina, após dois meses (média de um mês de epilepsia crônica), foram sacrificados por decaptação e logo depois os corações destes ratos foram isolados e gentilmente canulados para serem submetidos à técnica de Langendorff com pressão constante para avaliação da função ventricular e suscetibilidade a arritmia cardíaca (isquemia/reperfusão). Os parâmetros basais dos corações isolados, após 20 minutos de estabilização, não mostraram diferenças quando comparados os grupos e estão representados na (Tabela 5)

Tabela 5. Valores basais expressos em média \pm desvio padrão da média

| | Controle | Epilepsia |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| PIS (mmHg) | 97,6 \pm 15,72 | 100,2 \pm 10,19 |
| PID (mmHg) | 11,6 \pm 1,31 | 10,57 \pm 1,01 |
| PDVE (mmHg) | 82,80 \pm 13,16 | 89,69 \pm 9,84 |
| dP/dt Máxima (mmHg/s) | 1699 \pm 214,3 | 1942 \pm 175,1 |
| dP/dt Mínima (mmHg/s) | 1366 \pm 189,2 | 1627 \pm 128,5 |
| FC (bpm) | 220,7 \pm 16,74 | 237,3 \pm 17,32 |
| Fluxo coronariano (ml/min) | 11,13 \pm 1,59 | 9,24 \pm 0,62 |

PIS pressão intraventricular sistólica, PID pressão intraventricular diastólica, PDVE Pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo, dp/dt máxima velocidade de contração intraventricular, dp/dt mínima velocidade de relaxamento intraventricular, FC frequência cardíaca, Fluxo coronariano.

Após os vinte minutos de estabilização a artéria coronária anterior esquerda, foi submetida a ligadura para interrupção de fluxo da solução de KH. A ligadura foi mantida por quinze minutos e depois desfeita para o reestabelecimento do fluxo.

Assim que o coração passou a ser completamente reperfundido os parâmetros foram registrados por mais trinta minutos. Vale ressaltar que os parâmetros: PIS, PID, dp/dt máxima, dp/dt mínima, FC e Fluxo coronariano, foram registrados durante todo o tempo de protocolo e avaliados, foi feita a média dos 5 minutos, tanto no período de isquemia quanto no período de reperfusão e depois comparados.

Como resultados encontramos que durante a isquemia tanto o coração dos ratos do grupo controle quanto do grupo epiléptico apresentaram piora da função ventricular. Porém, o coração dos ratos do grupo epilepsia parece sofrer mais com a condição isquêmica, uma vez que, no último minuto de isquemia tanto a PIS quanto a dp/dt máxima tiveram uma queda significativamente maior quando comparadas ao grupo controle. Já a dp/dt mínima apresentou quedas significativamente maiores, no coração isolado de ratos com epilepsia, desde o primeiro minuto de isquemia. De forma interessante após o reestabelecimento do fluxo coronariano os parâmetros relatados acima retornaram aos seus valores basais sem apresentarem diferenças quando comparados os grupos.

Outro resultado interessante é o fato de que durante a isquemia a FC do grupo controle não apresentou alterações significativas em relação ao período basal, no entanto durante o período de reperfusão apresentou um aumento significativo que perdurou os trinta minutos de registro. De maneira diferente, o coração isolado dos ratos com epilepsia, apresentou queda da FC durante a isquemia retornando aos valores basais após a reperfusão. A variação do fluxo coronariano foi a mesma para ambos os grupos em todos os momentos do protocolo experimental. Todos os resultados aqui relatados estão representados na (Figura 9)

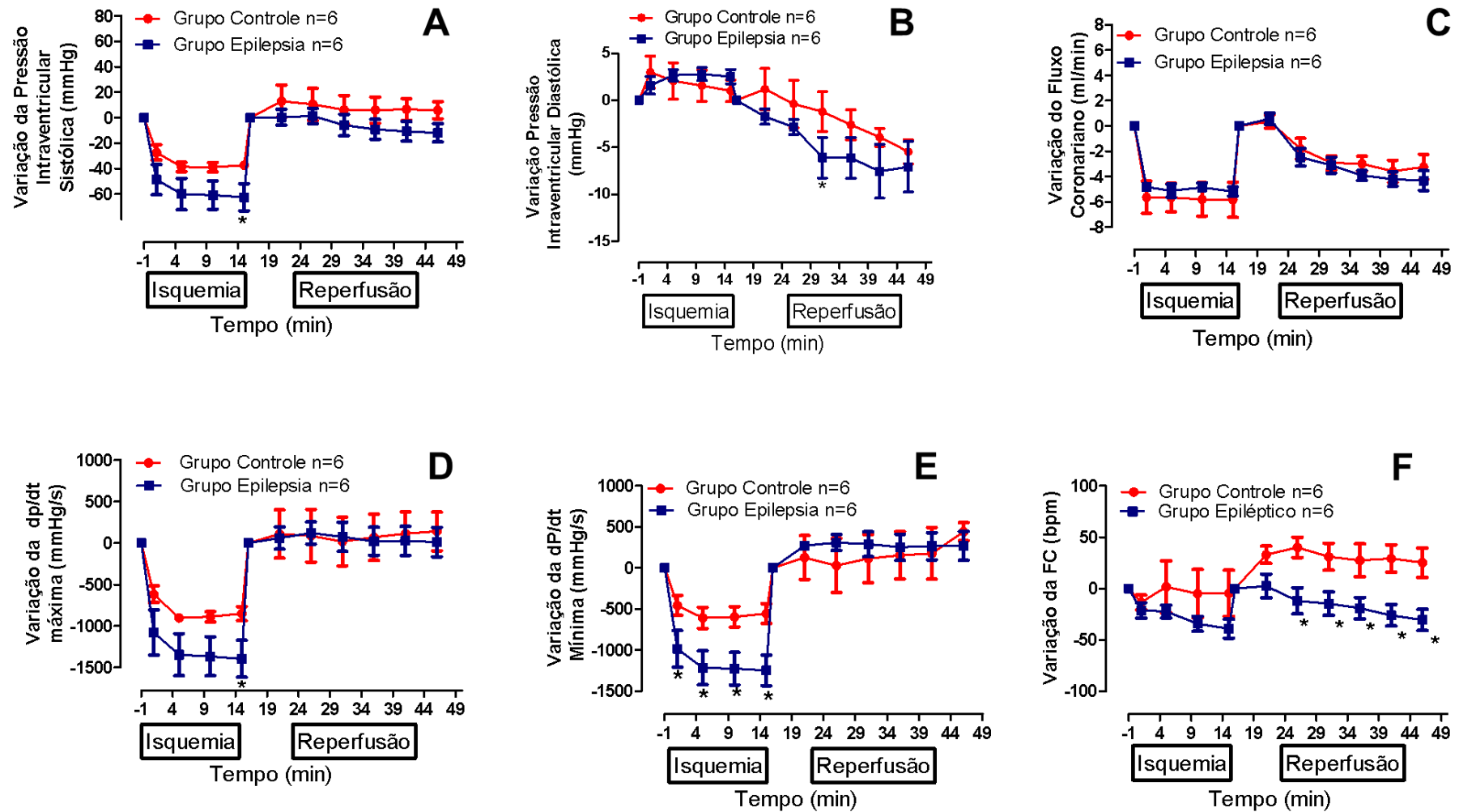


Figura 9– Variação média, a cada 5 minutos, da variação da pressão intraventricular sistólica (A), variação da pressão intraventricular diastólica (B), Fluxo Coronariano (C), variação da dp/dt máxima (D), variação da dp/dt mínima (E) e variação do fluxo coronariano (F) durante e após a ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda. Os valores estão expressos com média \pm EPM. Para a análise foi utilizado o método de análise de variância bifatorial de duas vias (Two-Way ANOVA) seguido do pós teste de Fisher. * $p < 0.05$ quando comparados os grupos no mesmo ponto do tempo.

Arritmias cardíacas foram avaliadas e classificadas de acordo com a presença e tempo de duração da taquicardia ventricular ou fibrilação ventricular, após a desobstrução da artéria coronariana anterior esquerda no período da reperfusão. Também foi usado o método de classificação de severidade de arritmias sugerido por Ferreira et al., (2001). Não encontramos diferenças significativas quando comparados os grupos controle e epilepsia (Figura 10).

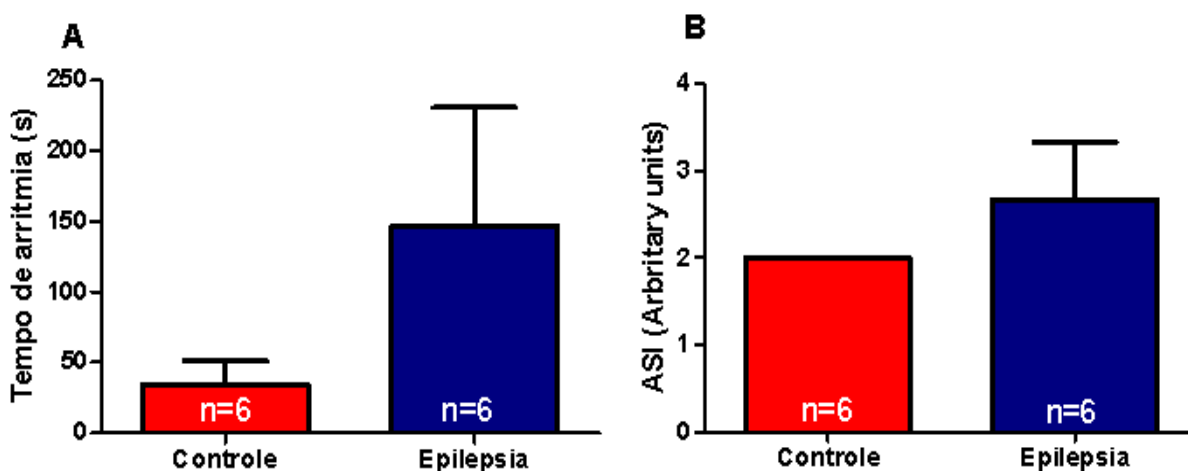


Figura 10. Tempo médio de duração das arritmias (A) e índice de severidade das arritmia (ASI) (B) em corações isolados de ratos submetidos ao modelo de epilepsia pela pilocarpina. Os valores estão expressos com média \pm EPM foi utilizado o teste t – Student para a comparação dos grupos e foi considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

4.2. Alterações histológicas

Foram investigados os índices de massa ventricular e também deposição de colágeno do coração dos ratos do grupo controle e grupo epiléptico. O índice de massa ventricular foi obtido pela razão do peso do ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia do animal, análise essa, que não mostrou diferenças quando comparados os grupos (Figura 11).

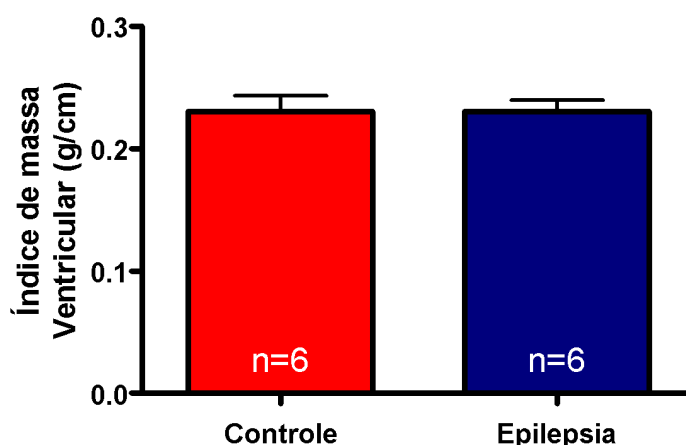


Figura 11. Índice de Massa Ventricular de corações isolados de ratos submetidos ao modelo de epilepsia pela pilocarpina. Os valores estão expressos com média \pm EPM foi utilizado o teste t – Student para a comparação dos grupos e foi considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

Para se avaliar a deposição de colágeno foi feita uma secção transversa de quatro micrômetros do ventrículo esquerdo do coração isolado dos ratos com e dos ratos sem epilepsia. A avaliação levou em consideração regiões dos cortes que apresentavam vasos sanguíneos e regiões sem vasos sanguíneos. Assim, após as análises, o tecido cardíaco dos animais com epilepsia apresentou aumento significativo da produção de colágeno na matriz extracelular (Figura 12 e 13).

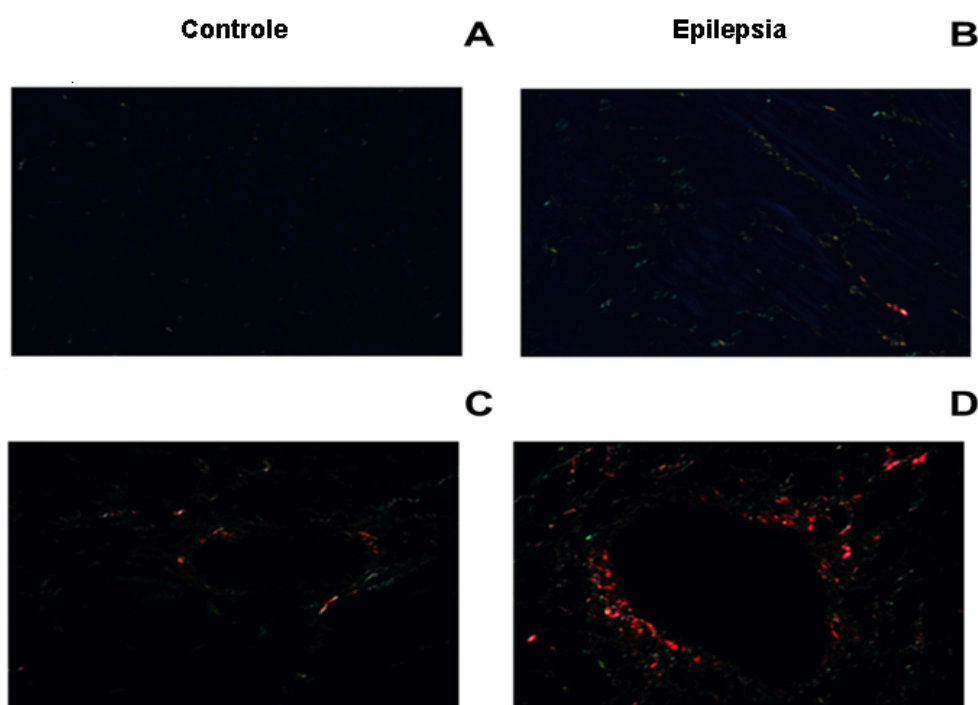


Figura 12. Fotomicrografias representativas das amostras de corações de ratos do grupo controle e grupo epilepsia sendo, **A** regiões da lamina sem a presença de vasos sanguíneos e **C** com vasos sanguíneos; e do grupo epilepsia sendo **B** regiões da lamina sem a presença de vasos sanguíneos e **D** regiões da lamina com presença de vasos sanguíneos. Nota-se que a coloração vermelha indica a presença de colágeno.

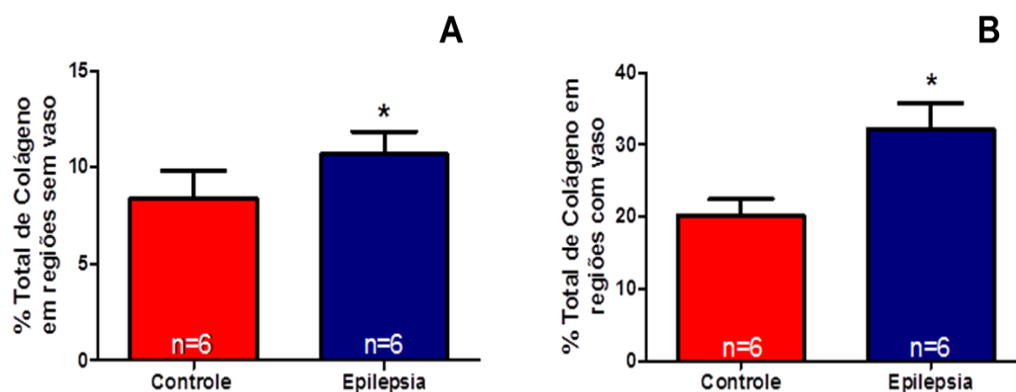


Figura 13—Valores médios da porcentagem de colágeno em regiões livres de vasos sanguíneos (A) e em regiões com vasos sanguíneos (B) de cortes histológicos de ventrículo dos ratos do grupo controle e grupo epilepsia. Os valores estão expressos com média \pm EPM. Teste t-Student foi utilizado para análise estatística * $p < 0,05$.

4.3. Expressão de KIR 6.1 e KIR 6.2

Foi avaliada, pela técnica de Western Blot, a expressão de canais para potássio dependentes de ATP no ventrículo esquerdo isolado de ratos do grupo controle e do grupo epilético. Os resultados mostraram que a expressão das proteínas KIR 6.1 e KIR 6.2 não foi diferente quando comparados os grupos (Figura 14).

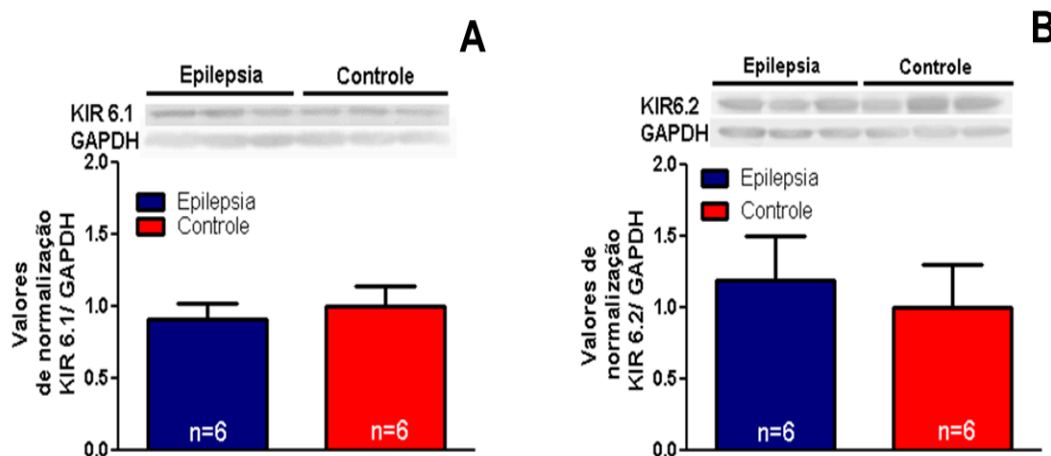


Figura 14. Valores normalizados (pela expressão de GAPDH) da expressão da proteína KIR 6.1 (A) e da proteína KIR 6.2 (B) em amostras de ventrículo esquerdo do coração de ratos do grupo controle e do grupo epilepsia. Os valores estão expressos com média \pm EPM. Teste t-Student foi utilizado para análise estatística e diferenças consideradas significativas se $p < 0,05$.

4.4. Efeito do modelo de epilepsia pela pilocarpina sobre a reatividade aórtica

Foi realizada uma avaliação da reatividade de anéis de aorta torácica em banho de órgãos. Para o teste foram feitas curvas com concentrações crescentes de

fenilefrina: (10^{-9} ; 3×10^{-9} ; 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} e 10^{-5}) mol/L para testar contração seguidas de curvas com concentrações crescentes de acetilcolina: (10^{-9} ; 3×10^{-9} ; 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} e 10^{-5}) mol/L para avaliar o relaxamento tanto na presença quanto na ausência do tecido endotelial vascular. Vale ressaltar que a presença de endotélio é definida quando a acetilcolina leva a um relaxamento de no mínimo 80% da contração máxima pela fenilefrina. Nossos resultados mostraram que, na presença de endotélio, os anéis de aorta torácica dos ratos com epilepsia contraíram menos quando comparados aos do grupo controle. O mesmo não foi observado em anéis em que o endotélio foi retirado. Também não encontramos diferenças no relaxamento na resposta às concentrações de acetilcolina tanto na presença quanto na ausência de endotélio. As curvas estão representadas na (Figura 15)

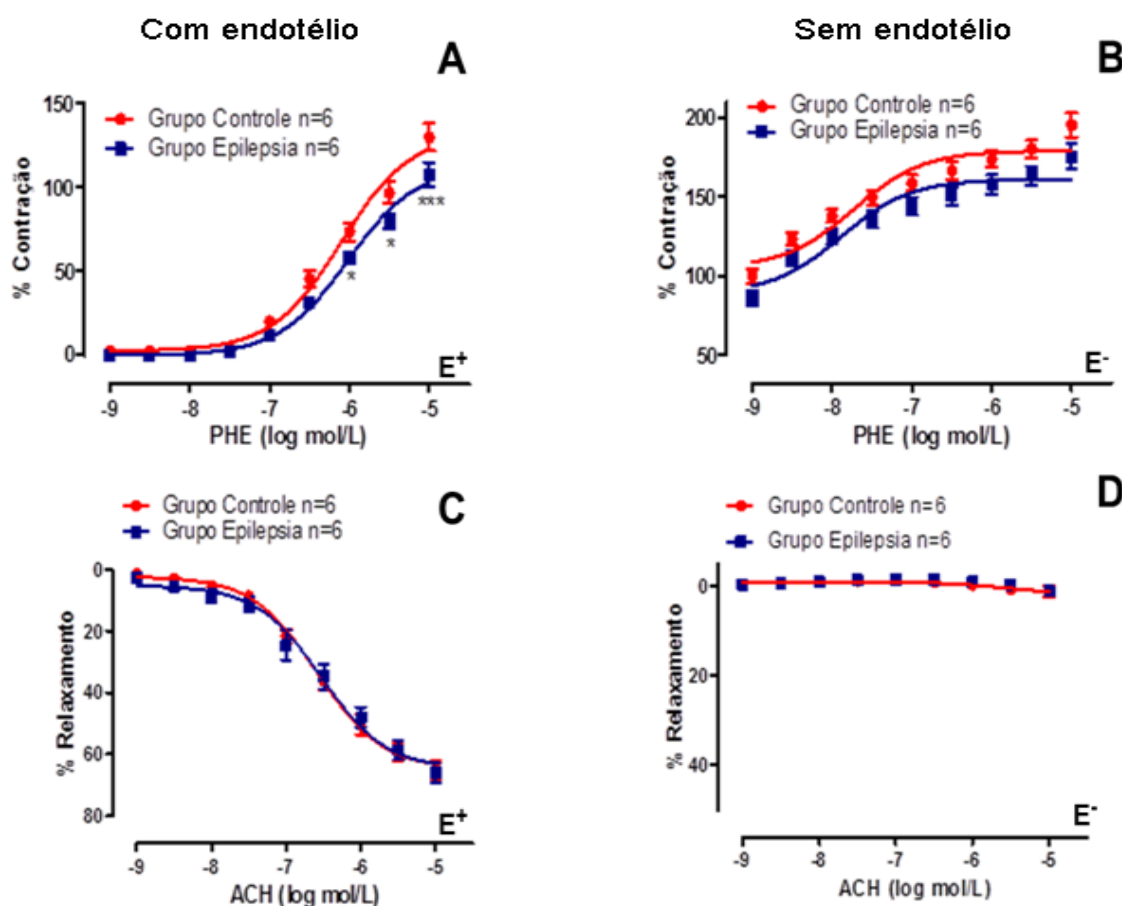


Figura 15. Curvas dose-resposta de fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} mol/L) realizadas de forma crescente e acumulativa, tanto em anéis com endotélio funcional (A), quanto em anéis com endotélio removido mecanicamente (B) e Curvas dose-resposta de Acetilcolina (10^{-10} - 10^{-6} mol/L) foram realizadas de forma crescente e acumulativa, tanto em anéis com endotélio funcional (C), quanto em anéis com endotélio removido mecanicamente (D). Os valores estão expressos com média \pm EPM. Two-Way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni foi utilizado para análise estatística. * $p < 0,05$

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado a função cardíaca e suscetibilidade a arritmias sob condição isquêmica em coração isolado de ratos com epilepsia induzida pelo modelo da pilocarpina. Além disso avaliamos a reatividade aórtica e a deposição de colágeno bem como a expressão de canais para potássio dependentes de ATP.

Usando o modelo da pilocarpina foi possível controlar variáveis importantes como sexo, idade e tempo de epilepsia. Neste sentido, os resultados mostraram piora da função ventricular dos animais, durante a isquemia, bem como maior deposição de colágeno que pode estar relacionada à piora da função ventricular. Tais achados mostraram maior vulnerabilidade do coração de ratos com epilepsia durante a condição isquêmica podendo estar relacionada à SUDEP.

Partindo do ponto de vista clínico, muitos estudos tem demonstrado alterações cardíacas em pacientes com epilepsia (ANSAKORPI et al., 2002; ZIJLMANS et al., 2002; SCORZA et al., 2007). Foi observado em nosso trabalho, do ponto de vista morfológico, um aumento significativo da deposição de colágeno na matriz extracelular do tecido cardíaco, que é indicativo de fibrose. Estes resultados corroboram com os trabalhos já descritos na literatura. Em autópsia realizadas em indivíduos epilépticos com SUDEP, revelaram alterações micro e macroscópicas no tecido cardíaco como: dilatação e hipertrofia cardíaca; fibrose nas paredes de pequenas artérias coronárias; atrofia dos cardiomiócitos; degeneração miofibrilar; infiltração leucocitária que sugere miocardite focal e alterações morfológicas do sistema de condução cardíaca(NATELSON et al., 1998; KLOSTER; ENGELSKJØN, 1999; OPESKIN et al., 2000);

Ainda, em seres humanos, estudos usando a troponina I como marcador de patologia cardíaca, onde o aumento da sua concentração plasmática gera a suspeita da existência de lesões ao nível do tecido cardíaco, Eskandarian e colaboradores não encontraram níveis plasmáticos de troponina I aumentados em pacientes com epilepsia corroborando com estudos anteriores(ESKANDARIAN et al., 2011). Porém, o fato dos níveis de troponina I não estarem aumentados não significa ausência de lesão cardíaca, mesmo porque a alteração detectável dos níveis desta proteína depende de fatores temporais relacionados ao momento do insulto, onde lesões antigas talvez não sejam detectadas por este método (ESKANDARIAN et al.,

2011).Em nosso estudo encontramos uma maior deposição de colágeno indicando remodelamento cardíaco, que dependendo do tipo de colágeno depositado, pode levar a prejuízo da função cardíaca (MILL; VASSALLO, 2001).

Além disso, estudos experimentais já mostraram a ocorrência de hipertrofia cardíaca 8 a 12 dias após a indução de status epiléticos por lítio/pilocarpina,(OPESKIN et al., 2000). O que vai na contramão dos nossos resultados onde não encontramos diferença na relação do peso da massa cardíaca/ pelo comprimento da tibia (índice de massa ventricular g/cm) em ambos os grupos. Porém, embora existam resultados controversos na literatura e, na maioria das vezes, quando encontradas alterações, estas não estarem em níveis considerados de grande risco para a população em geral, se somados a todos os fatores que envolvem um indivíduos que tem epilepsia: aumento da modulação simpática, queda do tônus parassimpático, ocorrência de apneias com dessaturação de hemoglobinas durante as crises, algumas alterações morfológicas observadas no miocárdio, por mais leves que sejam, poderão ser suficientes para a gênese de focos arritmogênicos nesses pacientes(JORGE et al., 2000; SCORZA et al., 2007; SEVCENCU; STRUIJK, 2010).

A diminuição da PIS, $+dP/dt$, $-dP/dt$ no período de isquemia e a redução da PID e frequência cardíaca no período de reperfusão demonstrados em nossos resultados revelaram um claro prejuízo da função ventricular dos ratos com epilepsia. Esses efeitos podem ser decorrentes do fato de que, durante o processo isquêmico, o oxigênio molecular poderia passar por uma sequência de reações que levaria a sua redução formando espécies reativas de oxigênio (ERO), como o ânion superóxido, o radical hidroxila e, ainda, peróxido de hidrogênio. O dano celular por estas ERO ocorre a partir da sua interação com lipídios de membrana e algumas proteínas essenciais. O dano celular do miocárdio poderia, então, levar a uma depressão da função cardíaca e, ao mesmo tempo, depleção de antioxidantes endógenos como: catalase, glutatona reduzida e glutatona peroxidase (EVORA et al., 1996). Após a reperfusão há um maciço influxo de cálcio para a célula, provavelmente por alteração da permeabilidade de membrana. A lesão de reperfusão é proporcional ao tempo de perfusão isenta de cálcio. As lesões iniciais ocorrem na mitocôndria e no sarcolema com subsequente aparecimento de características bandas de contratatura(EVORA et al., 1996; SILVA JR et al., 2002).A desoxigenação causa lesão do sarcolema, da membrana basal, desorganização

mitocondrial e outras alterações tissulares, indicando que a reintrodução do oxigênio inicia um rápido e grave processo de lesão celular (EVORA et al., 1996; SILVA JR et al., 2002; FRANCISCHETTI et al., 2010).

No estudo de Damasceno et al., (2013), onde foi realizado o protocolo experimental de coração isolado de Langendorff (isquemia/reperfusão), com ratos wistar WAR audiogênicos, observaram diminuição da frequência cardíaca, tensão sistólica e não encontraram diferença significativa quanto à avaliação do fluxo coronariano durante todo o protocolo experimental. No período da isquemia houve queda de 50% do fluxo coronariano em ambos os grupos estudados. Os resultados do presente trabalho corroboram com o estudo de Damasceno et al., (2013), confirmando a redução significativa da frequência cardíaca durante todo o período de reperfusão nos corações dos ratos com epilepsia e sem diferença significativa quanto ao fluxo coronariano em ambos os grupos. Os autores ainda mostraram que alterações no ECG como prolongamento do intervalo QT associado com a elevação da amplitude de pico de Ca^{2+} pode aumentar o risco de arritmias ventriculares. Portanto, WAR podem ter uma forte tendência para desenvolver arritmias cardíacas e apresentar um aumento nas arritmias, contribuindo para a piora da função ventricular.

Foi demonstrado em estudos clínicos e experimentais que as crises epiléticas são acompanhadas pela ativação simpática, resultando na alteração do controle cardíaco e na sua atividade elétrica que pode provocar taquicardia e hipertensão arterial. No entanto, o sistema nervoso autônomo poderia estar relacionado com o desencadeamento da SUDEP (HOTTA et al., 2009).

Alterações do ritmo e condução cardíacas são comuns durante as crises convulsivas, especialmente nas crises generalizadas (NEI et al., 2000). Mudanças no traçado eletrocardiográfico (ECG) com anormalidade potencialmente grave, incluindo depressão do segmento ST e inversão da onda T, foram observados em pacientes no período ictal e pós-ictal (NEI et al., 2000; OPHERK et al., 2002). Incluindo fibrilação atrial, taquicardias supraventriculares e fibrilação ventricular e prematura despolarização (JANSEN; LAGAE, 2010).

Em um outro estudo realizado em Centro de Lewis entre 1989 e 1993, foi realizado o registro de eletroencefalograma (EEG) e ECG durante pelo menos duas descargas epiletiforme em 11 pacientes que depois sofreram SUDEP, e de outros 11 pacientes que apresentavam idade e sexo correspondentes aos 11 primeiros

pacientes, também com crises tônico-clônicas não controladas por medicamento. Observaram neste estudo que, um alargamento do QT pode ser um fator predisponente para arritmia(TAVERNOR et al., 1996). O que pode, portanto, sugerir que a isquemia miocárdica associada com aumento da atividade simpática pode levar ao surgimento de arritmias (NEI et al., 2000).

Pacientes com epilepsia podem experimentar manifestações clínicas relacionadas com a ativação do sistema nervoso autônomo durante as crises epilépticas (OPHERK et al., 2002). E também são acompanhadas de alterações respiratórias (BATEMAN et al., 2008). A taquicardia frequentemente vem acompanhada por crises convulsivas e provavelmente está relacionada ao aumento do tônus simpático(JANSEN; LAGAE, 2010).Bradicardia e bradiarritmias são menos frequentes (BRITTON et al., 2006). Além disso, a epilepsia pode ser acompanhada por mudanças autonômicas que persistem além do período ictal. Em uma meta-análise foi demonstrado que vários trabalhos clínicos mostram que a variabilidade da frequência cardíaca, em pacientes com epilepsia, está diminuída mostrando que estes tem uma redução do tônus vagal, o que por si só, é um fator de risco para arritmias graves e morte súbita cardíaca(LOTUFO et al., 2012).

Em modelos experimentais também há evidências que mostram maior suscetibilidade a arritmias por parte de animais com epilepsia. Damasceno e colaboradores utilizando ratos WAR mostraram que em um protocolo de isquemia/reperfusão, estes tinham maior suscetibilidade a arritmias. Neste sentido conduzimos o mesmo protocolo em ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina. Ao avaliar o tempo de arritmia durante o protocolo experimental (isquemia/reperfusão) não foi encontrado diferenças significativas entre os grupos. O mesmo foi observado ao avaliar a severidade de arritmias utilizando a escala de ASI(FERREIRA et al., 2001) mostrando que nossos resultados não mostraram a mesma tendência apresentada por Damasceno e colaboradores(2013).

Além disso, avaliamos a expressão de canais para potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), porque estes canais podem estar envolvidos no processos arritmogênico e de cardioproteção. Estes canais, foram basicamente identificados por Noma em 1983, em tecidos de cardiomiócitos ventricular. Onde foi isolado a membrana do cardiomiócito do porquinho-da-índia (GROSS, 1998). A partir da sua descoberta nas células cardíacas, os canais de K_{ATP} , também tem sido evidenciados

em outros tecidos como: músculo liso, músculo esquelético, pâncreas e tecido cerebral (GROSS, 1998).

Os canais de potássio dependentes de ATP (K-ATP), são proteínas de membrana com permeabilidade seletiva ao potássio. O receptor de sulfoniluréia 1 (SUR1), membro da superfamília *ATP-binding cassette* (ABC) encontra-se na região regulatória do K-ATP e foi assim denominada por ser sítio de ligação das sulfonilúreas, classes de fármacos utilizadas no tratamento de diabetes melito do tipo 2 (DM2). O canal iônico KIR6.2, denominado de *potassium inwardly-rectifying channel*, está localizada na região formadora de poros (BRYAN et al., 2004; ASHCROFT, 2006).

Por tanto considera-se que SUR possa ser o sensor da relação ATP/ADP, muito importante na atividade do canal. Os genes KIR 6.2 e SUR1 estão localizadas conjuntamente no cromossomo 11 (11p. 15.1) e estão sobre regulação de um promotor comum, regulado pelo o mesmo fator de transcrição, entretanto desconhecido, permitindo que as expressões dos dois genes sejam intrinsecamente associadas (SMITH et al., 2007).

Foram encontradas duas isoformas de KIR6 (KIR6.1 e KIR6.2) e duas proteínas SUR (SUR1 e SUR2) são formadas por *splicing* alternativo do RNA primário, e conferem propriedades fisiológicas e farmacológicas distintas sobre a complexidade do canal, sendo a isoforma SUR2A é predominantemente encontrada no músculo esquelético e cardíaco (FLAGG et al., 2012).

Os canais K_{ATP} , são altamente expressos no sarcolema e na mitocôndria, têm sido associados a efeito cardioprotetor (CHICCO et al., 2007; COLE et al., 1991). No entanto, acredita-se que esses canais atuem como sensores capazes de identificar o equilíbrio iônico e bioenergético celular, no intuito de preservarem a homeostase cardíaca durante situações de estresse metabólico (GROSS, 1998). Para desempenhar o seu papel, seu funcionamento é baseado na quantidade de ATP disponível no citosol. Porém os canais K_{ATP} ficam fechados durante presença abundante de ATP citosólico, mas a diminuição de ATP, em decorrência de estresse metabólico como um processo isquêmico, estimula sua abertura (GOLBIDI; LAHER, 2011; CHICCO et al., 2007; COLE et al., 1991).

Quando ocorre um processo isquêmico, ocorre uma depleção de ATP, então os canais iônicos perdem a sua função e levando ao aumento de Ca^{2+} intracelular, que leva a diminuição de ATP (MURPHY; STEENBERGEN, 2008). O acúmulo de

Ca^{2+} gera uma sobrecarga na mitocôndria, principalmente quando a isquemia é seguida da reperfusão. O fornecimento de O_2 permite novamente a produção de ATP, a lesão isquêmica e de reperfusão provoca alterações da cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias, o que gera a produção de radicais livres de oxigênio (RLO)(MURPHY; STEENBERGEN, 2008). O aumento de RLO, de Ca^{2+} mitocondrial e a diminuição do potencial transmembrana das mitocôndrias que se seguem à isquemia-reperfusão levam à abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (PTPM)(MURPHY; STEENBERGEN, 2008).O PTPM é um canal mitocondrial transmembrana multiproteico que está ausente ou fechado em condições normais. A abertura do PTPM em resposta à isquemia leva à liberação de proteínas da mitocôndria direto para o citoplasma, por exemplo o citocromo (HEUSCH et al., 2010). Estas proteínas provocam uma ativação da cascata das caspases, e os baixos níveis de ATP, geram alterações da homeostasia iônica levando à ruptura da membrana plasmática e morte celular(HEUSCH et al., 2010).

A abertura dos canais K-ATP, via ativação da PKC, estará envolvida na cardioproteção. A sua ativação despolariza as mitocôndrias, reduz a captação de Ca^{2+} e os seus níveis durante a reperfusão, mantendo a integridade dos organelas celulares;(SANTOS et al., 2002; BORGES; LESSA, 2014).Diminui também a atividade dos canais iônicos dependentes de voltagem e conserva ATP durante a isquemia pois reduz a sua hidrólise(SANTOS et al., 2002; HEUSCH et al., 2010).

Em relação aos canais K_{ATP} presentes no sarcolema, uma vez abertos, há efluxo de K^+ do cardiomiócito, que provoca a hiperpolarização da células cardíaca e a redução no número de potenciais de ação(NICHOLS et al., 1991). Contudo, limita a entrada de Ca^{2+} pelos canais do tipo L e evita o acúmulo intracelular de Ca^{2+} (GOLBIDI; LAHER, 2011). Ocorrendo a redução na demanda metabólica cardíaca, fazendo com que a atividade na cadeia de transporte de elétrons seja diminuída, evitando, assim, a produção de ERO (NICHOLS et al., 1991).

No presente estudo não foi encontrada alteração na expressão das proteínas KIR 6.1 e KIR 6.2, nos animais com epilepsia e no seu respectivo grupo controle. Este resultado pode ser devido ao período de epilepsia destes animais ter sido de apenas um mês. Talvez se o período de epilepsia fosse maior, poderia gerar alterações de aumento ou diminuição nas expressão destas proteínas.

Como relatado anteriormente, as crises epilépticas são acompanhadas pela ativação simpática, resultando em alterações do controle cardiovascular que leva a

hipertensão arterial, taquicardia e instabilidade elétrica no do coração (HOTTA et al., 2009; JANSEN; LAGAE, 2010). Portanto, alterações no sistema nervoso autônomo podem estar envolvidas no desencadeamento da morte súbita (ROVERE et al., 1998; FAZAN et al., 2011). O barorreflexo é o mecanismo mais importante para o controle de curto prazo da pressão arterial (ROVERE et al., 1998; FAZAN et al., 2011). A sensibilidade do barorreflexo reduzida pode ser a causa e / ou consequência de desequilíbrio autonômico associado a várias patologias cardiovasculares caracterizada pelo aumento da susceptibilidade à morte súbita (ROVERE et al., 1998; FAZAN et al., 2011). Além disso, foi demonstrado (COLUGNATI et al., 2005) que ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina tem FC de base aumentada comparada a ratos livres desta condição. Esses fatores associados podem levar a alterações do controle vascular por alterações do endotélio vascular. Neste sentido, buscamos avaliar a reatividade de anéis de aorta torácica isolada de ratos com epilepsia. Nossos resultados mostraram uma diminuição da porcentagem da força de contração mediante a diferentes concentrações de fenilefrina nos anéis de aorta isolados de ratos com epilepsia quando comparado ao controle. Vale a pena ressaltar que tal alteração, apenas foi observada, na presença de endotélio. Entretanto, as curvas de resposta com acetilcolina para avaliação da porcentagem de relaxamento em anéis de aorta com e sem endotélio não foi encontrada diferença significativa entre os grupos. Assim, aparentemente a resposta endotelial frente a estimulação simpática parece estar alterada nos ratos com epilepsia. Fica clara a necessidade de novos experimentos, com abordagens diferentes, no sentido de se entender qual o real mecanismo responsável por esta resposta, no entanto, este achado já nos coloca numa nova direção, dentre as várias possíveis, para busca do entendimento dos mecanismos envolvidos na SUDEP.

Sumarizando, nossos resultados mostraram que os corações dos ratos com epilepsia possuem piora da função ventricular durante a isquemia comparados com o respectivo grupo controle, tal quadro não se mantém após a reperfusão. Também não encontramos diferenças entre o grupo controle e grupo epilepsia no que se refere a suscetibilidade a arritmias por isquemia/reperfusão, a mesma situação se aplicou para a expressão de canais para potássio dependentes de ATP. Ainda referente aos corações, a deposição de colágeno é maior no coração dos ratos com epilepsia sugerindo fibrose mais intensa quando comparado ao controle, contribuindo para piora da função ventricular. E, por fim, encontramos diferença na

resposta de anéis de aorta com endotélio preservado, frente a estímulos com fenilefrina, dos ratos com epilepsia, apontando para alterações de controle endotelial mediante estímulos adrenérgicos que pode ser resultado das alterações de controle autonômico (aumento da FC e redução da VFC) presentes nesses animais.

6 CONCLUSÃO

- Os corações dos ratos submetidos ao modelo de epilepsia pela pilocarpina apresentam piora da função ventricular durante a isquemia.
- Os corações dos ratos com epilepsia possuem um aumento do nível de deposição de colágeno na matriz extracelular, indicando formação de tecido fibrótico.
- Neste trabalho não foram encontradas alterações na expressão da KIR.6.1 e KIR 6.2.
- Os anéis de aorta dos ratos com epilepsia submetidos às curvas de dose resposta de fenilefrina, houve uma resposta da diminuição da porcentagem da força de contração nos vasos com endotélio preservado.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE-VALENÇA, L. P. A.; VALENÇA, M. M.; VELASCO, T. R.; LEITE, J. P. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 1, p. 31–36, 2006.
- ANSAKORPI, H.; KORPELAINEN, J. T.; HUIKURI, H. V; et al. Heart rate dynamics in refractory and well controlled temporal lobe epilepsy. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 72, n. 1, p. 26–30, 2002.
- ASHCROFT, F. M. K(ATP) channels and insulin secretion: a key role in health and disease. **Biochemical Society transactions**, v. 34, n. Pt 2, p. 243–246, 2006.
- BATEMAN, L. M.; LI, C. S.; SEYAL, M. Ictal hypoxemia in localization-related epilepsy: Analysis of incidence, severity and risk factors. **Brain**, v. 131, n. 12, p. 3239–3245, 2008.
- BERG, A. T.; BERKOVIC, S. F.; BRODIE, M. J.; et al. Terminologia e conceitos revistos para organização de crises e epilepsias . Relatório da Comissão da ILAE de Classificação e. **Epilepsia**, p. 2005–2009, 2009.
- BETTING, L. E.; KOBAYASHI, E.; MONTENEGRO, M. A.; et al. Tratamento de epilepsia: Consenso dos Especialistas Brasileiros. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n. 4, p. 1045–1070, 2003.
- BORGES, J. P.; LESSA, M. A. Mecanismos Envolvidos na Cardioproteção Induzida pelo Exercício Físico : Uma Revisão Sistemática. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, p. 1–11, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRITTON, J. W.; GHEARING, G. R.; BENARROCH, E. E.; CASCINO, G. D. The ictal bradycardia syndrome: Localization and lateralization. **Epilepsia**, v. 47, n. 4, p. 737–744, 2006.
- BROPHY, G. M.; BELL, R.; CLAASSEN, J.; et al. Guidelines for the evaluation and management of status epilepticus. **Neurocritical Care**, v. 17, n. 1, p. 3–23, 2012.
- BRYAN, J.; VILA-CARRILES, W. H.; ZHAO, G.; BABENKO, A. P.; AGUILAR-BRYAN, L. Toward linking structure with function in ATP-Sensitive K⁺ Channels. **Diabetes**, v. 53, n. 3, p. S104–S112, 2004.
- CASELLA, E. B.; MÂNGIA, C. M. F. Abordagem da crise convulsiva aguda e estado de mal epiléptico em crianças. **Jornal de Pediatria**, v. 75, n. 2, p. 197–206, 1999.
- CAVANAGH, J. B.; MEYER, A. With Temporal Lobe Epilepsy *. **British Medical Journal**, , n. 1955, p. 1403–1407, 1956.
- CHICCO, A. J.; JOHNSON, M. S.; ARMSTRONG, C. J.; et al. Sex-specific and exercise-acquired cardioprotection is abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in the rat heart. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 292, n. 5, p. H2432–H2437, 2007.

COLE, W. C.; MCPHERSON, C. D.; SONTAG, D. ATP-regulated K⁺ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. **Circulation research**, v. 69, n. 3, p. 571–581, 1991.

COLUGNATI, D. B.; PAES GOMES, P. A.; ARIDA, R. M.; et al. Avaliação de parâmetros cardíacos em animais com epilepsia: Possível causa de morte súbita? **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 4, p. 1035–1041, 2005.

DAMASCENO, D. D.; SAVERGNINI, S. Q.; GOMES, E. R. M.; et al. Cardiac dysfunction in rats prone to audiogenic epileptic seizures. **Seizure**, v. 22, n. 4, p. 259–266, 2013.

DANTAS, F. G.; RIBEIRO, C. D.; RAMOS, W. Epilepsia em Celebidades. **Epilepsy and clinical neurophysiology**, v. 14, n. 2, p. 71–75, 2008.

DREIFUSS, F. E.; BANCAUD, J.; HENRIKSEN, O.; RUBIO-DONNADIEU, F. Proposal for Revised Clinical and electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures. **Epilepsia**, v. 22, p. 489–501, 1981. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1157.1981.tb06159.x/full>>. .

ENGEL, J.; WIEBE, S.; FRENCH, J.; et al. Practice parameter: temporal lobe and localized neocortical resections for epilepsy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology, in association with the American Epilepsy Society and the American Association of Neuro. **American academy Neurology**, v. 60, p. 538–547, 2003.

ESKANDARIAN, R.; ASGHARI, N.; DARBAN, M.; GHORBANI, R. Cardiac troponin levels following complicated and uncomplicated epileptic seizures. **Archives of Medical Research**, v. 42, n. 6, p. 439–442, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2011.09.002>>. .

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; et al. Lesão de Isquemia-Reperusão . Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 66, n. 4, p. 239–245, 1996.

FALCONER, B.; RAJS, J. Post-Mortem findings of cardiac lesions in epileptics: A preliminary report. **Forensic Science**, v. 8, p. 63–71, 1976.

FAZAN, R.; OLIVEIRA, M. DE; OLIVEIRA, J. A. C.; SALGADO, H. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Changes in autonomic control of the cardiovascular system in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain. **Epilepsy and Behavior**, v. 22, n. 4, p. 666–670, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2011.09.010>>. .

FERREIRA, A J.; SANTOS, R. A; ALMEIDA, A P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. **Hypertension**, v. 38, p. 665–668, 2001.

FLAGG, T. P.; ENKVETCHAKUL, D.; KOSTER, J. C.; NICHOLS, C. G. NIH Public Access. **Physiological reviews**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W. B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de. **Revista Brasileira cirurgia cardiovascular**, v. 25, n. 4, p. 575–584, 2010.

- FREITAS, R. M. Sistemas de neurotransmissão envolvidos no modelo de epilepsia: Uma revisão de literatura. **Revista Neurociencias**, v. 19, n. 1, p. 128–138, 2011.
- GOLBIDI, S.; LAHER, I. Molecular mechanisms in exercise-induced cardioprotection. **Cardiology research and practice**, p. 1–15, 2011.
- GOMES, M. M. Mortalidade Atribuída à Epilepsia , às Suas Doenças Subjacentes ou às condições não relacionadas a ela: Uma síntese. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 16, n. 3, p. 100–105, 2010.
- GROSS, G. J. Recombinant cardiac ATP-sensitive potassium channels and cardioprotection. **Circulation**, v. 98, n. 15, p. 1479–1480, 1998.
- GUEDES, F. A.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; LEITE, J. P. Plasticidade Neuronal Associada à Epilepsia do Lobo Temporal Mesial : Insights a partir de Estudos em Humanos e em Modelos Animais. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, p. 10–17, 2006.
- GUILHOTO, L. M. F. F. Revisão Terminológica e Conceitual para Organização de Crises e Epilepsias : Relato da Comissão da ILAE de. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 17, n. 3, p. 2009–2013, 2011.
- HEUSCH, G.; BOENGLER, K.; SCHULZ, R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy grail of cardioprotection. **Basic research in cardiology**, v. 105, n. 2, p. 151–154, 2010.
- HOTTA, H.; KOIZUMI, K.; STEWART, M. Cardiac sympathetic nerve activity during kainic acid-induced limbic cortical seizures in rats. **Epilepsia**, v. 50, n. 4, p. 923–927, 2009.
- JANSEN, K.; LAGAE, L. Cardiac changes in epilepsy. **Seizure**, v. 19, n. 8, p. 455–460, 2010. BEA Trading Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2010.07.008>>. .
- JORGE, C. .; VALÉRIO, R. M. F.; YACUBIAN, E. M. Bradicardia Como Manifestação. **Arquivo Neuropsiquiatria**, v. 58, p. 919–923, 2000.
- KANDRATAVICIUS, L.; HALLAK, J. E. C.; LEITE, J. P. Psicose e depressão na epilepsia do lobo temporal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 13, n. 4, p. 163–167, 2007.
- KLOSTER, R.; ENGELSKJØN, T. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP): a clinical perspective and a search for risk factors. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 67, n. 4, p. 439–444, 1999.
- KWAN, P. A.; MARTIN, J.; BRODIE, M. D. Early identification of refractory epilepsy. **The new England journal of medicine**, v. 342, p. 314–9., 2000.
- LAMBERTS, R. J.; BLOM, M. T.; NOVY, J.; et al. Increased prevalence of ECG markers for sudden cardiac arrest in refractory epilepsy. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 10, p. 1–5, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24946773>>. .

- LEESTMA, J. E.; KALELKAR, M. B.; TEAS, S. S.; JAY, G. W; HUGHES, J. R. Sudden unexpected death associated with seizures: Analysis of 66 cases. **Epilepsia**, v. 25, n. 1, p. 84–88, 1984.
- LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, p. 511–517, 1990.
- LEONI, T. B.; COAN, A. C.; CENDES, F. Análise Comparativa do Volume Hipocampal e Talâmico em Pacientes com Epilepsia de Lobo Temporal Mesial com e sem Resposta Adequada ao Tratamento Farmacológico. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 18, n. 2, p. 41–44, 2012.
- LOTUFO, P. A.; VALIENGO, L.; BENSEÑOR, I. M.; BRUNONI, A. R. A systematic review and meta-analysis of heart rate variability in epilepsy and antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 53, n. 2, p. 272–282, 2012.
- LUCENA, I. DE; FERREIRA, M. Mortalidade por epilepsia no Brasil , 1980-2003. **Ciência e saúde coletiva**, v. 12, n. 1, p. 89–94, 2009.
- MARINO JR, R.; ZANETTI, M. V. Tratamento cirúrgico das epilepsias Surgical treatment of epilepsy. **Revista Medicina (São Paulo)**, v. 83, n. 3-4, p. 141–146, 2004.
- MILL, J. G.; VASSALLO, D. V. Hipertrofia cardíaca. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 63–75, 2001.
- MOREIRA S R G. Epilepsia : concepção histórica , aspectos conceituais , diagnóstico e tratamento. **Mental**, , n. 3, p. 107–122, 2004.
- MURPHY, E.; STEENBERGEN, C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. **Physiological reviews**, v. 88, n. 2, p. 581–609, 2008.
- NASHEF, L. Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions. **Epilepsia**, 1997.
- NASHEF, L.; WALKER, F.; ALLEN, P.; et al. Apnoea and bradycardia during epileptic seizures: relation to sudden death in epilepsy. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 60, p. 297–300, 1996.
- NATELSON, B. H.; SUAREZ, R. V; TERRENCE, C. F.; TURIZO, R. Patients with epilepsy who die suddenly have cardiac disease. **Archives of neurology**, v. 55, n. 6, p. 857–860, 1998.
- NEI, M.; HO, R. T.; SPERLING, M. R. EKG abnormalities during partial seizures in refractory epilepsy. **Epilepsia**, v. 41, n. 5, p. 542–548, 2000.
- NICHOLS, C. G.; RIPOLL, C.; LEDERER, W. J. ATP-sensitive potassium channel modulation of the guinea pig ventricular action potential and contraction. **Circulation research**, v. 68, n. 1, p. 280–287, 1991.

NORONHA, A. L. A.; BORGES, M. A.; MARQUES, L. H. N.; et al. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. **Epilepsia**, v. 48, n. 5, p. 880–5, 2007.

OLIVEIRA, J.; GOUVEIA, O. Transtornos psiquiátricos associados à epilepsia. **Psiquiatria clínica**, v. 30, n. 5, p. 160–164, 2003.

OLIVEIRA, L. P.; CORDEIRO, E. F. C.; SOUZA, G. R.; SANTANA, T. T. A.; SILVA NETO, C. P. Esclerose Hipocampal e Epilepsia do lobo temporal mesial: Uma revisão de literatura. **Rev Ciênc Saúde Nova Esperança**, v. 11, n. 1, p. 106–111, 2013.

OPESKIN, K.; THOMAS, A.; BERKOVIC, S. F. Does cardiac conduction pathology contribute to sudden unexpected death in epilepsy? **Epilepsy Research**, v. 40, n. 1, p. 17–24, 2000.

OPHERK, C.; COROMILAS, J.; HIRSCH, L. J. Heart rate and EKG changes in 102 seizures: Analysis of influencing factors. **Epilepsy Research**, v. 52, n. 2, p. 117–127, 2002.

PETROFF, O. A C.; PETROFF, O. A C.; PAN, J. W.; et al. Magnetic Resonance Spectroscopic studies of neurotransmitters and energy metabolism in epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, p. 40–50, 2002.

RAMALHO, J.; SILVA, C.; CRUZ, C. Intervenção Precoce na Epilepsia. **Revista Brasileira de Educação especial**, Marília, v. 15, n. 3, p. 359–368, 2009.

REYNOLDS, E. H. The ILAE / IBE / WHO Epilepsy Global Campaign History. , v. 43, n. September 1996, p. 9–11, 2002.

RICHERSON, G. B. Serotonin: The Anti-Sudden death amine? **Epilepsy currents / American Epilepsy Society**, v. 13, n. 5, p. 241–4, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3854735&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

RISS, J.; CLOYD, J.; GATES, J.; COLLINS, S. Benzodiazepines in epilepsy: Pharmacology and pharmacokinetics. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 118, n. 2, p. 69–86, 2008.

ROVERE, M. T. L.; BIGGER JR, J. T.; MARCUS, F. I.; MORTARA, A.; SCHWARTZ, P. J. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. **The Lancet**, v. 351, p. 478–484, 1998.

SANDER, J. W.; SHORVON, S. D. Incidence and prevalence studies in epilepsy and their methodological problems: a review. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 50, n. 7, p. 829–839, 1987.

SANTOS, P. D.; KOWALTOWSKI, A. J.; LACLAU, M. N.; et al. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP- sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 283, n. 1, p. H284–H295, 2002.

- SCHLINDWEIN-ZANINI, R.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Aspectos neuropsicológicos da epilepsia do lobo temporal na infância. **Revista Neurociências**, v. 17, p. 46–50, 2008.
- SCORZA, F. A.; ALBUQUERQUE, M. DE; ARIDA, R. M.; CAVALHEIRO, E. A. Alterações cardiovasculares e morte súbita nas epilepsias. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 65, p. 461–466, 2007.
- SCORZA, F. A.; ARIDA, R. M.; ALBUQUERQUE, M. DE; CAVALHEIRO, E. A. Epilepsias e Hipertensão Arterial Sistêmica. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 4, p. 219–224, 2006.
- SCORZA, F. A.; ARIDA, R. M.; ALBUQUERQUE, M. DE; CAVALHEIRO, E. A. Morte súbita na epilepsia: todos os caminhos levam ao coração. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 3, p. 199–200, 2008.
- SCORZA, F. A.; ARIDA, R. M.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. D. G.; et al. The pilocarpine model of epilepsy: What have we learned? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 345–365, 2009.
- SCORZA, F. A.; CYSNEIROS, I. R. M.; ALBUQUERQUE, I. I. M. DE; et al. Sudden unexpected death in epilepsy : an important concern. **Clinics**, v. 66, p. 65–69, 2011.
- SEVCENCU, C.; STRUIJK, J. J. Autonomic alterations and cardiac changes in epilepsy. **Epilepsia**, v. 51, n. 5, p. 725–737, 2010.
- SHORVON, S. D. Classificação etiológica da epilepsia. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1052–1057, 2011.
- SILVA JR, O.; CENTURION, S.; PACHECO, E.; et al. Basics aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 96–100, 2002. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502002000900020&script=sci_arttext> . .
- SMITH, A. J.; TANEJA, T. K.; MANKOURI, J.; SIVAPRASADARAO, A. Molecular cell biology of KATP channels: implications for neonatal diabetes. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 9, n. 21, p. 1–17, 2007.
- SPENCER, S. S. Neural Networks in Human Epilepsy : Evidence of and Implications for Treatment. **Epilepsia**, v. 43, n. 3, p. 219–227, 2002.
- STÖLLBERGER, C.; FINSTERER, J. Cardiorespiratory findings in sudden unexplained/unexpected death in epilepsy (SUDEP). **Epilepsy Research**, v. 59, n. 1, p. 51–60, 2004.
- TAVERNOR, S. J.; BROWN, S. W.; TAVERNOR, R. M. E.; GIFFORD, C. Electrocardiograph QT lengthening associated with epileptiform EEG discharges - A role in sudden unexplained death in epilepsy? **Seizure**, v. 5, n. 1, p. 79–83, 1996.
- TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARZ, M.; et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural brain research**, v. 9, n. 3, p. 315–335, 1983.

VARGAS, L. F. C. Muerte súbita e inesperada en la epilepsia (SUDEP). **Medicina Legal de Costa Rica**, v. 29, n. 1, p. 43–52, 2012.

YACUBIAN, E. M. T. Proposta de Classificação das Crises e Síndromes Epilépticas . **Revista Neurociências**, v. 10, n. 2, p. 49–65, 2002.

ZIJLMANS, M.; FLANAGAN, D.; GOTMAN, J. Heart rate changes and ECG abnormalities during epileptic seizures: Prevalence and definition of an objective clinical sign. **Epilepsia**, v. 43, n. 8, p. 847–854, 2002.