



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

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE APNEIAS OBSTRUTIVAS  
INDUZIDAS EM RATOS COM EPILEPSIA E SEU IMPACTO NO  
SONO, RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E DE ESFORÇO  
RESPIRATÓRIO**

**CLAUDIO QUINTINO DE LIMA JUNIOR**

**GOIÂNIA-GO**

**2020**

---

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

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

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) 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

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do(a) autor(a): Cláudio Quintino de Lima Junior

Título do trabalho: Caracterização e avaliação de apneias obstrutivas induzidas em ratos com epilepsia e seu impacto no sono, respostas cardiovasculares e de esforço respiratório

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> 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(à) autor(a) e ao(à) 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.

<sup>2</sup> As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**CLAUDIO QUINTINO DE LIMA JUNIOR**

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE APNEIAS OBSTRUTIVAS  
INDUZIDAS EM RATOS COM EPILEPSIA E SEU IMPACTO NO  
SONO, RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E DE ESFORÇO  
RESPIRATÓRIO**

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

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

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

**GOIÂNIA-GO**

**2020**

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

Lima Junior , Claudio Quintino de

Caracterização e avaliação de apneias obstrutivas induzidas em ratos com epilepsia e seu impacto no sono, respostas cardiovasculares e de esforço respiratório [manuscrito] / Claudio Quintino de Lima Junior . - 2020.

15, 86 f.: il.

Orientador: Prof. Diego Colugnati; co-orientador Aline Pansani. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos.

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

1. SUDEP. 2. Sono. 3. Quimiorreflexo. 4. Núcleo retrotapezoide. 5. Núcleos da Rafe. . I. Colugnati, Diego, orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 507 da sessão de Defesa de Dissertação de **Claudio Quintino de Lima Junior**, que confere o título de Mestre(a) em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Ao/s vinte e oito dias do mês de fevereiro de 2020, a partir da(s) 14:00 h, no(a) Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas I da Universidade Federal de Goiás, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Caracterização e avaliação de apneias obstrutivas em ratos com epilepsia e seu impacto no sono, respostas cardiovasculares e de esforço respiratório”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Diego Basile Colugnati (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Aline Priscila Pansani (ICB - UFG), coorientadora; Professora Doutora Renata Mazaro (ICB - UFG), membro titular externo; Professor Doutor Daniel Alves Rosa (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Diego Basile Colugnati, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de 2020.

## TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Caracterização e avaliação de apneias obstrutivas induzidas em ratos com epilepsia e seu impacto no sono, respostas cardiovasculares e de esforço respiratório



Documento assinado eletronicamente por **Diego Basile Colugnati, Professor do Magistério Superior**, em 27/03/2020, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Priscila Pansani, Professor do Magistério Superior**, em 27/03/2020, às 12:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Alves Rosa, Professor do Magistério Superior**, em 30/03/2020, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Mazaro Costa, Subchefe**, em 31/03/2020, às 17:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1187359** e o código CRC **594E8513**.

**CLAUDIO QUINTINO DE LIMA JUNIOR**

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE APNEIAS OBSTRUTIVAS  
INDUZIDAS EM RATOS COM EPILEPSIA E SEU IMPACTO NO  
SONO, RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E DE ESFORÇO  
RESPIRATÓRIO**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Diego Basile Colugnati  
Universidade Federal de Goiás

---

Prof. Dr. Daniel Alves Rosa  
Universidade Federal de Goiás

---

Profa. Dra. Renata Mazaro da Costa  
Universidade Federal de Goiás

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## **Dedicatória**

**Aos meus pais Claudio Quintino e Patrícia Agripina, e minha  
segunda mãe, Luzia Maria Guimarães**



## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente aos meus pais Claudio Quintino e Patrícia Agripina por entenderem a minha ausência neste tempo de estudo e por proporcionarem, as suas maneiras, todo o apoio emocional e coragem que me fizeram seguir em frente.

Agradeço as minhas tias Maria das Graças e Fabiana Luzia Guimarães por me apoiarem nas minhas decisões e acreditarem nas minhas capacidades me encorajando a nunca desistir.

Agradeço meus orientadores Dr. Diego Colugnati e Dra. Aline Pansani por todo o conhecimento transferido e pela paciência ao me orientar. Obrigado por permitirem meu crescimento profissional e realização pessoal.

Agradeço a todos os professores do programa de pós-graduação em ciências biológicas (PPGCB) em especial ao Prof. Dr. Carlos Castro e a Profa. Dra. Elizabeth Mendes, por todo o apoio prestado.

Agradeço ao Prof. Dr. Thiago Moreira, da Universidade de São Paulo, bem como sua equipe, em especial a Milene Malheiros, Felipe da Costa Souza e Octavio Maia, pelo suporte nos experimentos de Imunoistoquímica.

Agradeço ao Laboratório Integrado de Fisiopatologia Cardiovascular e Neurológica (LIFCaN) por me acolher em sua equipe. Em especial a Ms. Poliana Peres Ghazale, Ms. Karina Pereira Gomes e Ms. Pedro Paulo Pereira Braga, sem vocês este trabalho não seria possível. Além dos alunos Carlos Eduardo Gonçalves e Carlos Augusto Dourado.

Agradeço aos meus amigos, Romário Mascarenhas, Carlos Henrique, Florência Camila, Bruna Fernandes, Luana Monteiro, Ismaley Lacerda, Aryanne de Melo, Isabela Meira e Christoffer Novais pela amizade incondicional.

Agradeço as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro que permitiram o desenvolvimento deste e de tantos outros trabalhos. Desejo que este momento obscuro de desmonte da ciência seja apenas uma fase.

**“ Quando se trata de questões científicas, não existe autoridade acima da soberania da ciência. Nem militar, nem política, nem religiosa. ”**  
- Ricardo Galvão

## Sumário

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xvi
<b>RESUMO</b> .....	xvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 Epilepsia .....	13
1.2 Epilepsia do lobo temporal .....	14
1.3 Modelo de indução de epilepsia pela pilocarpina .....	15
1.4 Epilepsia e sono .....	17
1.5 Morte Súbita e Inesperada na Epilepsia .....	23
1.6 Controle respiratório e epilepsia .....	24
1.7 Apneia obstrutiva do sono e epilepsia .....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	30
2.1 Objetivo geral .....	30
2.2 Objetivos específicos .....	30
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	31
3.1 Animais .....	31
3.2 Indução da Epilepsia .....	31
3.3 Monitoramento de crises .....	32
3.4 Procedimentos cirúrgicos .....	32
3.5 Registros .....	34
3.6 Detecção das fases do ciclo sono-vigília .....	34
3.7 Indução das apneias durante o sono .....	35
3.8. Implante de cânula arterial e venosa. ....	36
3.9 Apneias em vigília .....	36
3.9 Teste de quimiorreflexo .....	37
3.10 Perfusão e coleta de tecidos: .....	37
3.11 Imunoistoquímica .....	37
3.12 Delineamento experimental .....	38
3.11 Análise Estatística .....	39

<b>4. RESULTADOS</b> .....	40
4.1 Parâmetros basais .....	42
4.2. Protocolo de apneias induzidas em sono.....	45
4.2.1. Efeito de 8h de apneia na fração do sono .....	45
4.2.2. Característica das apneias obstrutivas no sono NREM e REM .....	47
4.3 Parâmetros cardíacos e respiratórios durante as apneias obstrutivas durante a vigília e sono .....	50
4.4. Quimiorreflexo.....	54
4.5. Imunoistoquímica .....	56
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	59
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66
<b>ANEXOS</b> .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. – Antes de Cristo  
AAMS – Academia Americana de Medicina do Sono  
Ach – Acetilcolina  
ACS – Apneia Central do Sono  
AMPA – alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropioico  
AOS – Apneia Obstrutiva do Sono  
AP – Anteroposterior  
AUC – Area Under Curve (Área Sob a Curva)  
AVC – Acidente Vascular Cerebral  
Bötz – Bötzinger  
CA1 – Corno de Amon 1  
CA2 – Corno de Amon 2  
Ca<sup>2+</sup> – Íon Cálcio  
CA3 – Corno de Amon 3  
CEUA – Comissão de Ética em Uso de Animais  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono  
CPAP – Continuous Positive Airway Pressure  
ECG – Eletrocardiograma  
EEG – Eletroencefalograma  
ELT – Epilepsia do Lobo Temporal  
ELTM – Epilepsia do Lobo Temporal Mesial  
EMG – Eletromiograma  
EOG – Eletrooculograma  
EPM – Erro Padrão da Média  
ER – Esforço Respiratório  
FC – Frequência Cardíaca  
GABA – Gama-aminobutírico  
GRD – Grupo Respiratório Dorsal  
GRVc – Porção Caudal do Núcleo Respiratório Ventral  
GRVr – Porção Rostral do Núcleo Respiratório Ventral  
i.p. – Intraperitoneal  
IAH – Índice de apneia e hipopneia  
ILAE – Internacional League Against Epilepsy (Liga Internacional Contra Epilepsia)  
K<sup>+</sup> – Íon Potássio  
KCN – Cianeto de potássio  
M1 – Receptor muscarínico do tipo 1  
ML – Mediolateral  
Mt1 – Receptor de melatonina tipo 1  
Mt2 – Receptor de melatonina tipo 2  
NaCl – Cloreto de sódio  
NHS – Normal Horse Serum  
NK1 – Neurocinina do tipo 1

NMDA – N-metil-d-aspartato  
NREM – Non Rapid Eye Movimente (Movimento não rápido dos olhos)  
NTS – Núcleo do Trato Solitário  
NTS – Núcleo do Trato Solitário  
PAM – Pressão Arterial Média  
PBS – Tampão Fosfato-Salino  
PE-10 – Polietileno Número 10  
PE-50 – Polietileno Número 50  
pH – Pressão de Hidrogênio  
Phox2b – *paired-likehomeoboxgene-2b*  
PILO – Pilocarpina  
Pré-Bötz – Pré-Bötzinger  
REM – Rapid Eye Movimente (Movimento rápido dos olhos)  
Rmg – Rafe Magnus  
Rob – Rafe Obscurus  
Rpa – Rafe Pallidus  
RTN – Núcleo Retrotrapezóide  
s.c. – Subcutânea  
SAHOS – Síndrome da Apneia-Hipopneia Obstrutiva do Sono  
SARA – Sistema Ativador Ascendente  
SE – *Status Epilepticus*  
SHCC – Síndrome da Hipoventilação Congênita Central  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SUDEP – Sudden Unexpected Death in Epilepsy (Morte Súbita e Inesperada na Epilepsia)  
TrpOH – Triptofano Hidroxilase  
UFG – Universidade Federal de Goiás  
USP – Universidade de São Paulo  
VLPO – Região pré-óptica Ventrolateral

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Padrão eletroencefalográfico (EEG) e eletromiográfico (EMG), em rato, que diferenciam o estado de Vigília, sono NREM e sono REM. Nota-se, em vigília, ondas com alta frequência e baixa amplitude e uma alta atividade muscular. Em NREM, observa-se ritmo delta, caracterizado por alta amplitude e baixa frequência, acompanhado de uma diminuição significativa do tônus muscular. Em REM, prevalência de ritmo theta e atonia muscular. Fonte: Próprio autor. .... 17
- Figura 2: Representação do cérebro em plano sagital. Mostra as estruturas básicas e mecanismos de geração de vigília em humanos. São mostradas duas vias (setas em vermelho e verde) de ativação cortical. Fonte: Adaptado de Dyken et al. (2012)(33) ..... 19
- Figura 3: representação do cérebro em plano sagital mostra regiões promotoras do sono NREM encontram-se no hipotálamo anterior (principalmente da área pré-óptica ventrolateral) e inibem as regiões promotoras da vigília no hipotálamo e tronco cerebral durante o sono de ondas lentas. Fonte: Adaptador de Dyken et al. (2012)(33) ..... 20
- Figura 4: Representação do cérebro em plano sagital mostra regiões promotoras do sono REM compreendem células sleep-on do hipotálamo e do prosencéfalo basal que se encontram ativas, bem como as glutamatérgicas do sublocus coeruleus (SLC REM-on neurons) que promovem atonia REM através de projeção caudal. O sistema colinérgico do tronco cerebral também está ativo e estimula as alças talamocorticais para gerar o EEG dessincronizado similar ao da vigília. Fonte: adaptado de Dyken et al. (2012)(33)..... 22
- Figura 5: Desenho esquemático do tronco cerebral de roedores. Neuroanatomia do tronco cerebral por plano sagital mostrando a localização dos principais grupos respiratórios nos mamíferos. Abreviações: (7n) Núcleo Facial; (nA) Núcleo Ambíguos; (BotC) Complexo de Bötzing; (cVRG) Grupo Respiratório Ventrocaudal; (KF) Núcleo Kolliker-Fuse; (LRN) Núcleo Reticular Lateral; (Mo5) Núcleo Motor Trigeminal; (NTS) Núcleo do Trato Solitário; LPBN e LC formam o Núcleo Parabraquial; (preBotC) Complexo Pré-Bötzing; (vVRG) Grupo Respiratório Ventrorostrall; (7) Nervo Facial; (RPa) Rafe Pallidus, (ROb) Rafe Obscurus; (RMg) Rafe Magnus. Fonte: Adaptado de Moreira et al. (2011) ..... 25

Figura 6: Construção e implantação de balão traqueal, um cateter de balão de poliuretano fechado com um nó e inflado com água (A). Cateter inserido em um tubo de Teflon (B). Tubo de Teflon com balão esvaziado (C). Diagrama esquemático do implante (D). Implante inserido na traqueia (E). Balão intratorácico (F). Fonte: Schoolemmer et al 2011(115) .....	33
Figura 7: Diagrama esquemático do mecanismo de inflação do balão intratraqueal para indução da apneia obstrutiva. Neste mecanismo há um controlador de volume, um solenoide que empurra uma seringa de Hamilton preenchida com solução salina e conectada ao balão intratraqueal por meio de um tubo PE-20. Desta forma, quando a solenoide é ativada, injeta-se volume no balão, inflando-o; quando desativada, a seringa retorna à sua posição original desinflando o balão. Na máquina também há um reservatório de fluido para repor possíveis perdas de volume do balão. Adaptado de Schoorlemmer et al. (2011) (115).....	35
Figura 8: Delineamento experimental. Após 30 – 60 dias de período crônico os animais foram submetidos ao protocolo de apneia durante as fases específicas do ciclo sono-vigília. ....	39
Figura 9: Representação esquemática de registro de Vigília. Traçados típicos de EEG, EMG, EMG Power, NREM Power e REM Power. EMG Power indica a amplitude do EMG, enquanto o NREM Power e REM Power indicam as razões entre ondas do EEG $(\delta \times \alpha)/(\beta \times \gamma)$ e $\Theta^2/(\delta \times \alpha)$ , respectivamente. A faixa cinza representa o limiar.....	40
Figura 10: Representação esquemática da fase NREM. Traçados típicos de EEG, EMG, EMG Power, NREM Power e REM Power. EMG Power indica a amplitude do EMG, enquanto o NREM Power e REM Power indicam as razões entre ondas do EEG $(\delta \times \alpha)/(\beta \times \gamma)$ e $\Theta^2/(\delta \times \alpha)$ , respectivamente. A faixa cinza representa o limiar.....	41
Figura 11: Representação esquemática da fase REM. Traçados típicos de EEG, EMG, EMG Power, NREM Power e REM Power. EMG Power indica a amplitude do EMG, enquanto o NREM Power e REM Power indicam as razões entre ondas do EEG $(\delta \times \alpha)/(\beta \times \gamma)$ e $\Theta^2/(\delta \times \alpha)$ , respectivamente. A faixa cinza representa o limiar. ....	41
Figura 12: (A) Porcentagem ciclo sono-vigília durante 24 horas. (B) porcentagem do ciclo sono-vigília durante as 12h de claro e 12h de escuro. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. Controle x Epilepsia. Teste T –Student. Número de animais por grupo representado entre parênteses. *Comparado a REM do grupo controle, $p < 0,05$ . # NREM comparado com grupo controle, $p < 0,05$ . \$Vigília comparado com grupo controle, $p < 0,05$ . ....	42



Figura 13: Razão entre onda delta e onda theta nas 12 horas correspondentes às fases clara (A) e escura (B). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. Controle vs Epilepsia. Teste T. Número de animais por grupo representado entre parênteses - Student * $p < 0,05$ . ....	43
Figura 14: Traçados típicos de suspiro (a), apneia central do sono (b). Setas indicando o início e final de cada evento. ....	44
Figura 15: Quantidade de suspiros durante 8 horas de registro basal na fase clara do ciclo. Controle x epilepsia. Média $\pm$ EPM. Teste T-Student. Número de animais por grupo representado entre parênteses. ....	44
Figura 16: Número de apneias centrais (A) e duração de apneias centrais (B) durante 8 horas de registro basal na fase clara do ciclo. Controle x epilepsia. Média $\pm$ EPM. Teste T-Student. Número de animais por grupo representado entre parênteses, * $p < 0,05$ .....	45
Figura 17: Distribuição das apneias centrais nas diferentes fases do sono. Média $\pm$ EPM. Teste T-Student. Número de animais por grupo representado entre parênteses .....	45
Figura 18: (A) Porcentagem do ciclo sono-vigília durante 8 horas de apneia em NREM. (B) porcentagem do ciclo sono-vigília durante 8h de apneia em REM. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. Controle x Epilepsia. Teste T-Student * $p < 0,05$ .....	46
Figura 19: (A) Porcentagem de cada fase do ciclo sono-vigília durante 8 horas de sono basal comparado com 8 horas de sono de recuperação após apneias em sono NREM. (B) Porcentagem de cada fase do ciclo sono-vigília durante 8 horas de sono basal comparado com 8 horas de sono de recuperação após apneia em sono REM. Teste T-Student, * $p < 0,05$ .....	47
Figura 20: Distribuição das apneias deflagradas em sono NREM e REM para o grupo controle. Gráfico box plot (A) e gráfico de distribuição de frequência acumulada (B). NREM:978 eventos, 5 animais/REM: 498 eventos, 6 animais. Teste t-Student, Kolmogorov-Smirnov. * $p < 0,05$ . (+): média. ....	48
Figura 21: distribuição das apneias deflagradas em sono NREM e REM para o grupo epilepsia. Gráfico box plot (A) e gráfico de distribuição de frequência acumulada (B). NREM:1305 eventos, 9 animais/REM: 530 eventos, 7 animais. Teste t-Student, Kolmogorov-Smirnov. (+): média.....	48
Figura 22: distribuição das apneias deflagradas em sono NREM Controle vs Epilepsia. Gráfico box plot (A) e gráfico de distribuição de frequência acumulada (B).	

Controle:978 eventos, 5 animais/Epilepsia: 1305 eventos, 9 animais. Teste t não paramétrico, Kolmorov-smirnov * $p < 0,05$ . (+): média. ....	49
Figura 23: Distribuição das apneias deflagradas em sono REM Controle vs Epilepsia. Gráfico box plot (A) e gráfico de distribuição de frequência acumulada (B). Controle: 498 eventos, 6 animais/Epilepsia: 530 eventos, 7 animais. Teste t-Student, Kolmorov-smirnov * $p < 0,05$ . (+): média. ....	50
Figura 24: Frequência cardíaca (primeira coluna) e esforço respiratório (segunda coluna) em vigília (A e B), NREM (C e D) e REM (E e F) durante apneias de 6 segundos. Início da apneia é representado pelo tempo 0 e final da apneia representado pelo final da faixa cinza. ....	52
Figura 25: Frequência cardíaca (primeira coluna) e esforço respiratório (segunda coluna) em vigília (A e B), NREM (C e D) e REM (E e F) durante apneias de 10 segundos. Início da apneia é representado pelo tempo zero e final da apneia representado pelo final da faixa cinza ....	52
Figura 26: Variação da pressão arterial média frente à estimulação do quimiorreflexo. Gráfico temporal da média a cada segundo (A), resposta máxima (B), área sob a curva positiva durante a resposta (C), área sob a curva negativa pós-resposta (D). O início da resposta é representado pela linha tracejada, tempo zero indicado como KCN. Teste T-Student, * $p < 0,05$ . ....	54
Figura 27: Variação da frequência cárdica frente à estimulação do quimiorreflexo. Gráfico temporal da média a cada segundo (A), resposta máxima (B), área sob a curva negativa durante a resposta (C). O início da resposta é representado pela linha tracejada, tempo zero indicado como KCN. Teste T-Student.....	55
Figura 28: Variação da do esforço respiratório frente a KCN 40 $\mu$ g. Gráfico temporal (A), resposta máxima (B), área sob a curva positiva durante a resposta (C). O início da resposta é representado pela linha tracejada, tempo zero indicado como KCN. Teste T-Student.....	56
Figura 29: Contagem neuronal e/ou densidade óptica no RTN (A e B - Phox2B em vermelho; C e D: NK1 em verde), Pré-Botzinger (E e F) e Botzinger (G e H) de ratos controle (primeira coluna) e com epilepsia (segunda coluna).Test T-Student, * $p < 0,05$ . RTN: núcleo retrotrapezóide. Phox2B: paired like homeobox 2B. NK1: Neurocinina 1. Amb: núcleo ambíguo. ....	57
Figura 30: Contagem neuronal e/ou densidade óptica de neurônios positivos para TrpOH na RMg (A e B), RPa (C e D) e ROb (E e F) de ratos controle (primeira coluna)	

e com epilepsia (segunda coluna). Test T de Student,  $*p < 0,05$ . RMg: Rafe magnus; Rob: Rafe obscurus; RPa: Rafe pallidus. Py: trato piramidal; IO: Oliva Inferior; TrpOH: triptofano hidroxilase. Teste T não pareado,  $*p < 0,05$ . .....58

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Área sob a curva (AUC) e resposta máxima ( $\Delta$ máximo e $\Delta$ mínimo ) das respostas cardíacas e respiratórias durante e após apneia de 6 segundos em vigília, NREM e REM.....	53
Tabela 2: Área sob a curva (AUC) e resposta máxima ( $\Delta$ máximo e $\Delta$ mínimo ) das respostas cardíacas e respiratórias durante e após apneia de 10 segundos em vigília, NREM e REM.....	53

## RESUMO

A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns. As taxas de mortalidade são consideravelmente mais altas em indivíduos com epilepsia e a forma mais comum de morte relacionada a esta doença é a morte súbita na epilepsia (SUDEP), sendo que mecanismos multifatoriais relacionados às alterações cardíacas, autonômicas e respiratórias participam da SUDEP. A apneia obstrutiva do sono (AOS) tem incidência elevada em pacientes com epilepsia e é um fator de risco para a SUDEP. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a AOS em animais com epilepsia. Para isso, ratos *Wistar* (230-250g) foram submetidos ao modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina. Após 30-60 dias de epilepsia crônica, os animais foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para avaliação do sono, frequência cardíaca, esforço respiratório e indução de apneia. Os ratos com epilepsia apresentaram alteração do sono basal, com diminuição de REM no registro de 24h e aumento de vigília e diminuição de sono NREM na fase escura do ciclo. O sono NREM e REM destes animais apresentou maior porcentagem de ondas delta e o sono REM teve menor ondas theta. Os animais com epilepsia apresentaram aumento do número de apneias centrais espontâneas do sono. Interessante notar que nos animais controles, as apneias em REM foram mais longas que em NREM. Durante a AOS, as frações do sono não se alteraram nos grupos. No grupo com epilepsia, houve redução da fração de REM no período de 8 h imediatamente após o protocolo de apneia nesta fase. As respostas cardiovasculares e de esforço respiratório durante as AOS e no quimiorreflexo foram semelhantes às dos ratos controles, porém nos ratos com epilepsia houve tendência a menor esforço respiratório nas apneias em vigília e menor resposta pressora no quimiorreflexo. Os animais com epilepsia apresentam maior densidade de NK1 na região pré-Bötzinger e menor número de neurônios serotoninérgicos na Rafe Magnus e Pallidus. Portanto, ratos com epilepsia apresentam alteração do padrão sono-vigília na fase escura e aumento da relação de Delta/Theta no sono. Os mecanismos relacionados ao término da AOS estão alterados na epilepsia, possivelmente por alteração nos neurônios de controle respiratório

**Palavras-Chave:** SUDEP, sono, quimiorreflexo, Núcleo retrotrapezoide, Núcleos da Rafe, Bötzinger.

## ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common neurological diseases. Mortality rates are considerably higher in individuals with epilepsy and the most common category of death related is Sudden Unexpected Death in Epilepsy (SUDEP). Multifactorial mechanisms related to autonomic and respiratory cardiac changes underlying SUDEP. Obstructive sleep apnea (OSA) has a high incidence in patients with epilepsy and it is a risk factor for SUDEP. The aim of this study was to characterize OSA in animals with epilepsy. For this, Wistar rats (230-250g) were submitted to Pilocarpine model of epilepsy. After 30-60 days of chronic epilepsy, the animals were submitted to surgical procedures to evaluation of sleep and heart rate, respiratory effort and induction of obstructive apneas. Rats with epilepsy had altered basal sleep, with decreasing REM in 24-hour record and increased wakefulness and decreased NREM sleep in the dark phase of the cycle. Both NREM and REM sleep of these rats had a higher percentage of delta waves, and REM had lower theta waves. Rats with epilepsy had higher spontaneous central sleep apneas. Control rats had REM-sleep apneas longer than NREM-sleep apneas. This difference did not occur in rats with epilepsy. OSA did not altered sleep fraction in any group. In Epilepsy group, there was decrease in REM fraction at the first 8 h of recovery sleep of REM-apneas. Cardiovascular and respiratory effort during OSA and chemoreflex response were similar between groups. However, in epilepsy, there was a tendency to low in both respiratory effort in awake apneas and pressure response induced by chemoreflex. In epilepsy, there was higher density of NK1 in pré-Bötzinger and lower number of serotonergic neurons in Raphe Magnus and Pallidus. Therefore, rats with epilepsy had alteration on sleep-wake cycle and in sleep-delta/theta ratio. Also, the mechanisms related to end of OSA were altered, possibly by alteration in neurons of respiratory control.

**Keywords:** SUDEP, sleep, chemoreflex, RTN, Raphe nuclei, Bötzing

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Epilepsia

A epilepsia é um dos transtornos neurológicos mais comuns (1,2). Em países desenvolvidos a incidência chega a 50:100.000 pessoas por ano, sendo mais comum em crianças e idosos. Em países em desenvolvimento esta incidência chega a dobrar, o que está intimamente relacionado às condições precárias de saneamento básico, e sistema de saúde, as quais estão associadas ao risco de infecções cerebrais, como por exemplo a neurocisticercose, e intercorrências no período pré-natal, peri-natal e pós-natal, contribuindo, assim, de forma significativa para maior incidência de epilepsia (1,2).

Os primeiros indícios de existência da epilepsia datam de 2000 a.C. em manuscritos que relatam detalhadamente manifestações convulsivas (3). Porém, apenas com avanços no estudo neurofisiológico a partir do século XIX foi que a epilepsia passou a ser tratada como doença. Antes disso, as crises epiléticas eram tratadas como causas sobrenaturais, causando assim um estigma sobre esta doença, que perdura até os dias de hoje (3).

Com os avanços no estudo da epilepsia, ela foi definida como um distúrbio neurológico capaz de gerar crises espontâneas e recorrentes acompanhadas de consequências neurológicas, cognitivas e sociais (4). A *International League Against Epilepsy* (ILAE), em seu último consenso, redefiniu as epilepsias como um conjunto de doenças cerebrais, caracterizadas pela ocorrência de duas crises em um intervalo de tempo maior que 24 horas, ou por apenas uma, quando o risco de recorrência for superior a 60% (4). A ILAE também propôs uma nova classificação da epilepsia, baseada na localização do foco epilético e na possível etiologia das crises. Sendo assim, a epilepsia pode ter foco localizado no lobo parietal, frontal, occipital e temporal. Quanto à etiologia, podem ser estruturais, genéticas, infecciosas, metabólicas, autoimunes e de causa desconhecida (5).

As crises epiléticas são caracterizadas por sinais e sintomas que acontecem devido a uma descarga excessiva e sincronizada na rede neuronal (6). As crises podem se manifestar de formas variadas, tais como manifestações motoras, sensoriais, sensitivas, autonômicas, cognitivas entre outras, sendo que um mesmo paciente pode apresentar formas diferentes de crise (6). É importante ressaltar que as

manifestações clínicas das crises dependem da área do córtex envolvida. Por exemplo, crises cujo foco é o lobo occipital podem apresentar manifestações visuais; quando o foco é no giro pós-central, podem ter sintomas sensoriais como parestesias (4).

Segundo a ILAE, as crises podem ser divididas em três grandes grupos: crises focais, crises generalizadas e crises focais, secundariamente generalizadas. As crises focais originam-se em locais limitados do encéfalo e permanecem restritas apenas a um dos hemisférios cerebrais. As crises generalizadas têm seu início em redes neuronais distribuídas nos dois hemisférios cerebrais. Por fim, crises secundariamente generalizadas tem início focal, porém se espalham para o hemisfério cerebral contralateral ao foco epileptogênico (4)

As crises generalizadas podem ser do tipo motoras e não motoras. As crises motoras podem ser classificadas como crises: tônico-clônicas, apenas clônica, apenas tônica, crises mioclônicas, crises mioclônica-tônica-clônicas, mioclônicas autonômicas, apenas autonômicas e espasmos epilépticos. As crises focais podem ser divididas em crises de início motor (automatismos, atônica, clônica, espasmos etc.) ou não motor (autonômica, cognitiva, emocional, sensorial etc.), ambas podendo ter ou não a perda de consciência. As crises com perda de consciência são consideradas crises discognitivas e são comuns nas crises com foco no lobo temporal (5,7).

Vale salientar que os fatores de risco para desenvolvimento da epilepsia variam com a idade e localização geográfica, podendo estar associados a infecções do sistema nervoso central (SNC), tumores e traumatismo. As Doenças cerebrovasculares, como acidente vascular cerebral (AVC), são os fatores de risco mais comuns em idosos (1,2).

## **1.2 Epilepsia do lobo temporal**

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é um dos tipos de epilepsia focal que apresenta uma importância significativa na clínica devido à sua gravidade, incidência e refratariedade aos tratamentos farmacológicos existentes (8,9). A forma mais comum de ELT é epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) que envolve áreas límbicas como córtex entorrinal, neocórtex temporal lateral, tálamo medial, lobo frontal inferior, amígdala basolateral e hipocampo (8,9).



Os pacientes com ELTM apresentam crises focais que se originam em estruturas límbicas do lobo temporal, com generalização secundária e perda da consciência (8,9). A esclerose mesial-hipocampal é um achado anatomopatológico característico da ELTM e é o resultado de intensa morte neuronal e gliose reativa. A formação hipocampal é a região mais acometida pela morte neuronal, especialmente as subregiões CA1, CA3 e hilo, com relativa preservação de CA2(8,9).

O processo que leva o encéfalo a desenvolver epilepsia é denominado epileptogênese. Este é um processo dinâmico, progressivo e de alta complexidade que altera a excitabilidade neuronal criando assim um ambiente propício à hiperexcitabilidade da região afetada, que desencadeará a formação de um foco epilético (9,10).

O estudo dos mecanismos relacionados à epileptogênese e geração das crises na ELT, bem como das repercussões das crises sobre os demais sistemas fisiológicos, é restrito em humanos. Sendo assim, torna-se essencial o estudo de modelos animais que mimetizem da melhor forma possível a ELT em humanos.

### **1.3 Modelo de indução de epilepsia pela pilocarpina**

Por questões éticas e metodológicas os estudos de mecanismos de doenças em humanos sempre foram muito limitados. Logo, reproduzir doenças humanas em modelos animais é uma grande vantagem na medicina experimental. Este método indireto de estudo vem melhorando de forma significativa a compreensão que há das doenças que acometem humanos.

No estudo da ELT tem sido comum a utilização de roedores que apresentam crises semelhantes às observadas neste tipo de epilepsia (11,12). Para indução e mimetização da ELT foram desenvolvidos modelos animais experimentais a partir do uso de quimioconvulsivantes como ácido caínico e a pilocarpina (PILO). Estes modelos mimetizam não apenas as crises, mas também o percurso da doença apresentada pelos pacientes com ELT. Estas semelhanças incluem lesão inicial que afeta o hipocampo e o lobo temporal, período de latência entre a lesão e o aparecimento da primeira crise espontânea e o período de manifestações crônicas da epilepsia. Além disso estes modelos apresentam também características histológicas, como esclerose hipocampal, semelhantes à ELT humana(11,12).

A pilocarpina é um alcaloide extraído das folhas do jaborandi (*Pilocarpus spp.*) (13). O modelo de indução utilizando a PILO foi descrito em 1983 por Turski et al. (14). Neste estudo foi mostrado que a administração da PILO, um agonista colinérgico muscarínico, em doses elevadas foi capaz de provocar alterações comportamentais e eletroencefalográficas que evoluíram até um estado epiléptico (14).

O estado epiléptico ou *status epilepticus* (SE) é uma condição resultante da falha dos mecanismos responsáveis pelo término da crise ou mecanismos que levam a crises anormais e prolongadas. Esta condição pode apresentar consequências em longo prazo incluindo morte neuronal e alterações nas redes neuronais (15).

A PILO age de forma aguda promovendo injúria tecidual que acarreta em morte neuronal, este processo pode levar de minutos a horas após o início do SE (16,17). Este dano tecidual leva a um quadro de reorganização neuronal, com duração variada (4 a 44 dias). Essa reorganização neuronal que levará à fase crônica do modelo acontece após a perda neuronal decorrente da fase aguda (16,17).

A capacidade da PILO em induzir o SE parece depender da ativação de receptores colinérgicos muscarínicos do subtipo M1, pois administração de PILO em camundongos *Knockout* para receptores M1 não foi capaz de desenvolver crise em resposta à administração da PILO(15).

Um estudo em cultura de neurônios do hipocampo mostrou que a PILO age em receptores M1 provocando desequilíbrio entre transmissão excitatória e inibitória nesta região levando, assim, ao SE (18). Outros estudos mais detalhados sugerem que a ativação de receptores M1 pela PILO altera as correntes de  $Ca^{2+}$  e  $K^+$  que aumentam a excitabilidade neuronal dando início às crises (19). Um estudo de microdiálise *in vivo* revelou que a PILO induz elevação nas concentrações do neurotransmissor excitatório glutamato no hipocampo(15). O aumento da excitabilidade aumenta a liberação de glutamato, que mantém a crise e a indução do SE. O glutamato age nos receptores NMDA e AMPA e aumenta ainda mais a entrada de  $Ca^{2+}$  nas células, o que provoca excitotoxicidade pelo  $Ca^{2+}$ , promovendo a morte neuronal (19). Outro mecanismo associado ao dano tecidual nesta região é o aumento da formação de radicais livres, juntamente com a diminuição do sistema antioxidante, além do aumento do processo inflamatório na região (17).

O aparecimento de alterações neuropatológicas, como morte neuronal, mediadas pela crise foram observadas em regiões do encéfalo como complexo

amigdalóide, tálamo, neocórtex, formação hipocampal, substância negra e córtex olfatório (14).

As alterações morfológicas, principalmente no hipocampo, têm sido descritas como características desse modelo como: brotamento de fibras musgosas, dispersão de células granulares, taxa de neurogênese aumentada e desenvolvimento de dendritos em células granulares basais (17,20). O brotamento das fibras musgosas refere-se ao crescimento de axônios de células granulares do giro dentado em decorrência da perda de seus alvos após a morte neuronal durante o período agudo do modelo. Estas fibras musgosas criam alças recorrentes de contato sináptico com dendritos das próprias células granulares na camada molecular interna do giro dentado, aumentando a excitabilidade. Este acontecimento é descrito como um dos responsáveis pela epileptogênese (9).

#### 1.4 Epilepsia e sono

O sono é dividido em duas fases principais: sono de ondas lentas (NREM ou sono não-REM) e sono paradoxal (REM). O sono NREM é caracterizado por redução do tônus muscular, eletro-oculograma (EOG) pouco ativo e presença de ondas eletroencefalográficas lentas, caracterizada por alta amplitude e baixa frequência, com predomínio do ritmo Delta ( $\delta$ ). A fase REM é caracterizada por atonia muscular, presença de movimentos rápidos dos olhos no EOG (de onde se origina o nome: *Rapid Eye Movement* – REM) e ondas eletroencefalográficas de baixa amplitude e alta frequência, com predomínio do ritmo Theta ( $\theta$ ) (figura 1)(21,22).

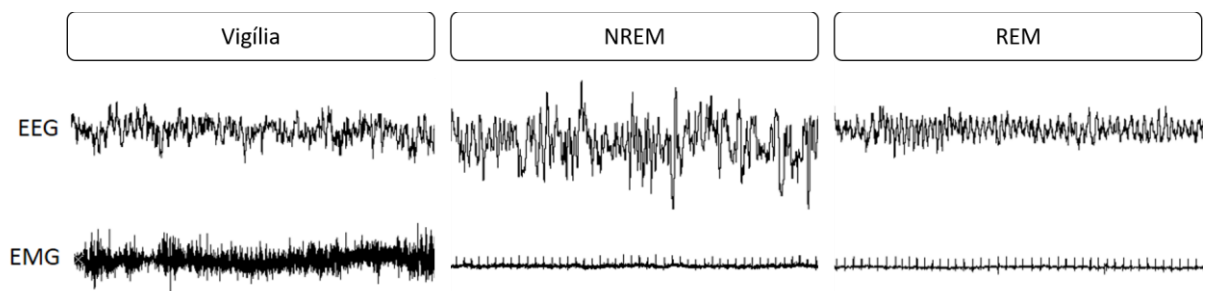


Figura 1: Padrão eletroencefalográfico (EEG) e eletromiográfico (EMG), em rato, que diferenciam o estado de Vigília, sono NREM e sono REM. Nota-se, em vigília, ondas com alta frequência e baixa amplitude e uma alta atividade muscular. Em NREM, observa-se ritmo delta, caracterizado por alta amplitude e baixa frequência, acompanhado de uma diminuição significativa do tônus muscular. Em REM, prevalência de ritmo theta e atonia muscular. Fonte: Próprio autor.

Sabe-se que em cada fase do ciclo sono-vigília o encéfalo é ativado de forma relativamente diferente. Com isto em mente, a vigília é oriunda de uma atividade complexa do encéfalo, na qual se mantém ativação cortical; portanto, reflete-se na dessincronização da atividade encefálica vista no EEG, assim como ativação de vias sensoriais e motoras que mantem o tônus muscular elevado(23,24). Vários mecanismos são descritos como geradores e mantedores do estado de vigília, entre estes mecanismos estão regiões localizadas no tronco encefálico como a formação reticular abrangendo as regiões do bulbo, ponte e mesencéfalo, onde há neurônios importantes para a ativação cortical na vigília(24). Estes neurônios formam o sistema ativador reticular ascendente (SARA) que ativa o córtex e mantém sua atividade elevada (23). O SARA é composto primariamente por quatro componentes principais: Locus Ceruleus (neurônios noradrenérgicos), núcleos da Rafe (neurônios serotoninérgicos) , núcleo tuberomamilar do hipotálamo (neurônios histaminérgicos) e tegmento pedúnculo pontinho lateral e dorsal (neurônios colinérgicos)(25).

A maioria destas vias também utiliza neurônios glutamatérgicos. Alguns estudos já demonstraram que a liberação de glutamato aumenta o estado de vigília(26). Neurônios GABAérgicos também são responsáveis pela regulação desta atividade(26). A formação reticular abrange a ponte, onde alguns neurônios mesopontinos apresentam atividade colinérgica. Durante a vigília, a atividade de neurônios colinérgicos e a liberação de acetilcolina estão aumentadas. No entanto, o estado de vigília não é mantido exclusivamente por neurônios colinérgicos, tendo em vista que a secção da região mesopontina, local dos núcleos colinérgicos da formação reticular, mantém a vigília(26). Desta forma, a vigília também é mantida pela ação de outros neurônios da formação reticular: neurônios noradrenérgicos do Locus ceruleus; dopaminérgicos, da região ventrolateral do mesencéfalo; e serotoninérgicos, presentes nos núcleos da Rafe (27,28).

O tálamo e o hipotálamo também têm participação importante na ativação cortical, pois lesões destas regiões provocam sonolência(29). A relação entre as regiões encefálicas e o ciclo vigília-sono não é simples. O hipotálamo, por exemplo, apresenta zonas com funções antagônicas, sendo o hipotálamo anterior (como o núcleo supraquiasmático e área pré-óptica) promotor do sono e o posterior (como o núcleo tuberomamilar) promotor da vigília(30–32). As vias e áreas ativadas durante a vigília estão esquematizadas na figura 2.

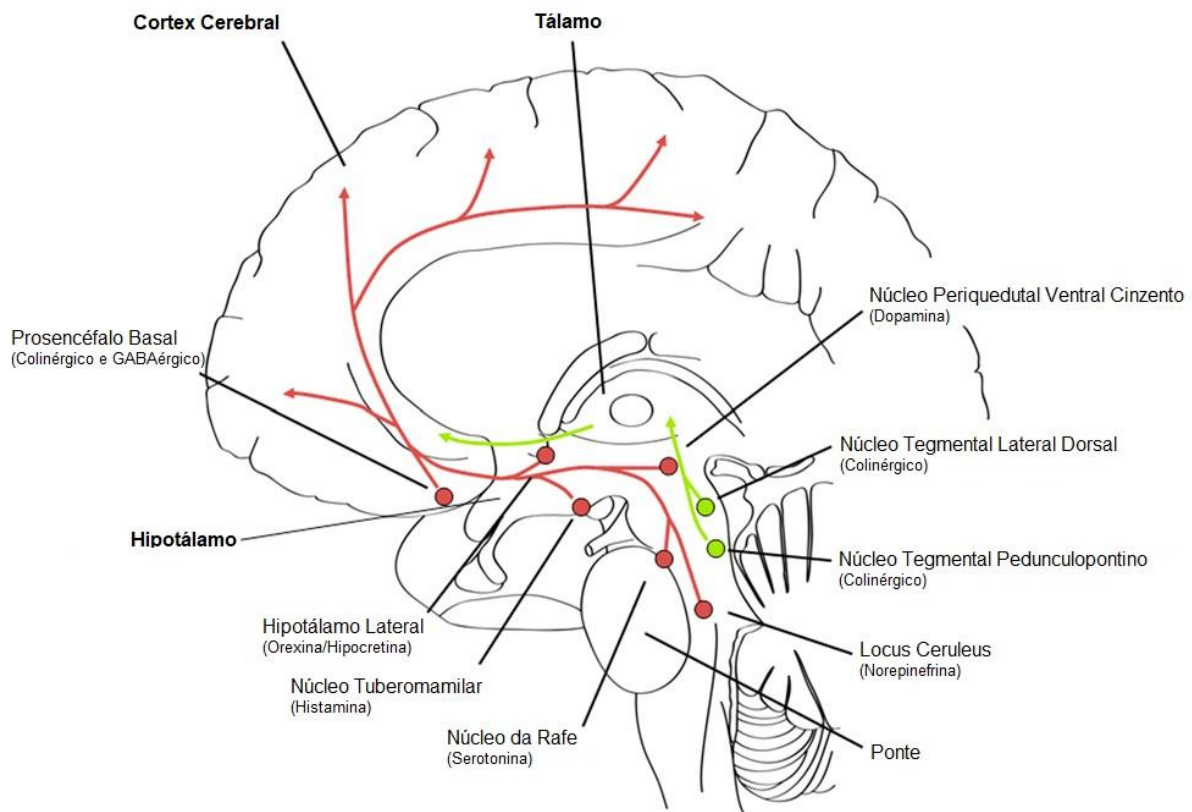


Figura 2: Representação do cérebro em plano sagital. Mostra as estruturas básicas e mecanismos de geração de vigília em humanos. São mostradas duas vias de ativação cortical: (1) Núcleos em vermelho definem um sistema ventral através do hipotálamo envolvendo núcleos hipotalâmicos no núcleo tuberomamilar e hipotálamo lateral que se comunicam com células colinérgicas e GABAérgicas e córtex cerebral; e (2) vias neuronais e núcleos na via verde definem uma rota talâmica dorsal que leva estimulação do tálamo, da linha média inespecífica e do núcleo intramamilar (enquanto inibe o núcleo reticular do tálamo). Ambos os grupos são ativados durante a vigília e sono REM e inibidos durante o sono NREM. Fonte: Adaptado de Dyken et al. (2012)(33)

A transição do estado de vigília para o sono também acontece de maneira a recrutar várias regiões do encéfalo, as quais também atuam na modulação autonômica. Assim, a transição Vigília-NREM envolve a ativação de neurônios GABAérgicos da área pré-optica ventrolateral (VLPO) do hipotálamo posterior, a qual inibe neurônios promotores da vigília (principalmente os neurônios presentes no SARA). Além disso, o VLPO envia projeções inibitórias para o núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, uma área simpatoexcitatória, o que culmina em redução da atividade simpática. O VLPO é um dos principais centros de manutenção do sono NREM, e esta fase é caracterizada pela redução da modulação simpática e aumento da parassimpática. Durante o sono NREM a sensibilidade ao barorreflexo é aumentada devido à inibição de núcleo parabraquial lateral, o qual exerce atividade inibitória sobre o Núcleo do Trato Solitário (NTS), região de aferência barorreceptora (34,35). Portanto, nesta fase o sistema simpático é inibido por neurônios GABAérgicos ativos durante o sono NREM. A atividade GABAérgica aumentada durante o sono

NREM contribui para que a atividade eletroencefalográfica, caracterizada por disparos rápidos na vigília, seja substituída por um padrão de disparos mais lentos e sincronizados (36).

A serotonina e o GABA possuem efeitos antagônicos sobre a modulação da fase NREM. A serotonina, neurotransmissor liberado principalmente por neurônios localizados nos núcleos da Rafe, dificulta a manutenção do sono NREM (37,38). Por outro lado, o neurotransmissor GABA, sendo um neurotransmissor inibitório, parece ter uma relação íntima com a sincronização cortical encontrada no sono NREM, sendo um grande facilitador deste estado de sono (39). A Figura 3 mostra as vias e regiões ativadas durante o sono NREM.

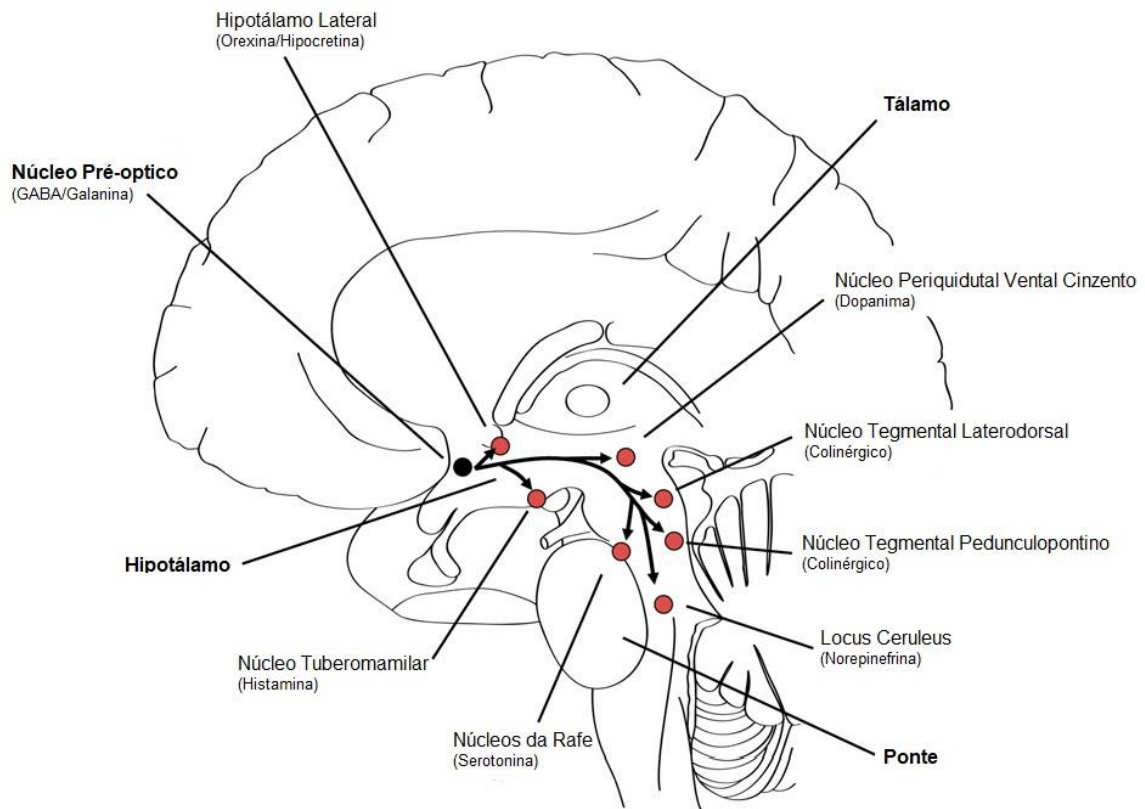


Figura 3: representação do cérebro em plano sagital mostra regiões promotoras do sono NREM encontram-se no hipotálamo anterior (principalmente da área pré-óptica ventrolateral) e inibem as regiões promotoras da vigília no hipotálamo e tronco cerebral durante o sono de ondas lentas. Círculos e linhas pretas indicam núcleos e vias inibidos durante o início do sono, enquanto círculos vermelhos indicam núcleos de vigília. Fonte: Adaptador de Dyken et al. (2012)(33)

Já o que diz respeito ao sono REM, é observado um aumento da atividade encefálica, com EEG dessincronizado. Nesta fase, há uma atividade hipocampal elevada com ondas de maior frequência e baixa amplitude, principalmente ondas theta ( $\theta$ : 6–10 Hz), além de atonia muscular exceto pelos músculos oculares (40). Os neurônios que estão ativos nesta fase do sono são conhecidos como neurônios REM-

on, e abrangem neurônios glutamatérgicos, GABAérgicos e principalmente colinérgicos. Por outro lado, os neurônios que estão inibidos nesta fase ou que quando ativos a inibem, são denominados de neurônios REM-off, os quais incluem principalmente neurônios noradrenérgicos, dopaminérgicos, histaminérgicos e serotoninérgicos. Os neurônios REM-on e REM-off estão distribuídos ao longo do tronco encefálico, hipotálamo e prosencéfalo basal (41–43)

Durante o sono REM os níveis de acetilcolina no tronco encefálico estão aumentados, ao passo que os níveis de monoaminas estão reduzidos (41,42). De fato, o aumento da acetilcolina, assim como de seus agonistas, aumenta a quantidade de sono REM, ao passo que a depleção desse neurotransmissor o suprime (44). Duas regiões com populações de neurônios colinérgicos, localizadas entre a ponte e o mesencéfalo, estão ativas nesta fase: o núcleo tegmental pedunculopontino e do núcleo tegmental laterodorsal (PPT/LDT). Estas regiões atuam na iniciação do sono REM, mas não em sua manutenção (42) e sua principal eferência é o núcleo Sub-Ceruleus (SubC), também denominado de núcleo subaterodorsal (SLD), localizado na ponte (41,42,45).

O SubC é a região geradora da atonia muscular, característica do sono REM. O SubC induz a atonia por duas vias principais, via projeções glutamatérgicas para interneurônios GABAérgicos/Glicinérgicos da coluna ventral da medula espinal, e via estimulação de neurônios GABAérgicos/Glicinérgicos da região ventral do bulbo, ambas as vias culminam na inibição dos neurônios motores (45) A região SubC também possui neurônios GABAérgicos, os quais inibem regiões denominadas REM-off. A substância cinzenta periaquedutal ventrolateral e o tegmento pontinho lateral (VIPAG/LPT) são os principais núcleos com neurônios REM-off, cuja função é inibir os neurônios REM-on, dentre eles, os localizados no SubC. Portanto, o início e manutenção de transições para o REM dependem do equilíbrio entre neurônios REM-on e REM-off. Além do SubC, outras regiões REM-on identificadas são a região pre-cerúlea (PC) e o núcleo parabraquial medial (MPB), as quais estão relacionadas à regulação do EEG hipocampal e cortical durante o sono REM, via projeções glutamatérgicas para o prosencéfalo basal e septo medial (41,46).

Enquanto o sono NREM possui maior modulação parassimpática, o sono REM apresenta maior modulação simpática. Isso ocorre porque os neurônios REM-on estimulam neurônios simpatoexcitatórios e inibem neurônios simpatoinibitórios, localizados, respectivamente na substância cinzenta periaquedutal lateral (IPAG) e

ventrolateral (vIPAG). Além disso, o SubC excita neurônios do núcleo reticular paragigantocelular (PGi) localizado no bulbo, os quais inibem neurônios cardiovascogais e estimulam regiões simpatoexcitatórias localizada na região ventrolateral do bulbo (RVLM/C1) (35). Portanto, a fase REM possui maior ativação simpática. A Figura 4 apresenta um esquema das áreas ativadas durante no sono REM.

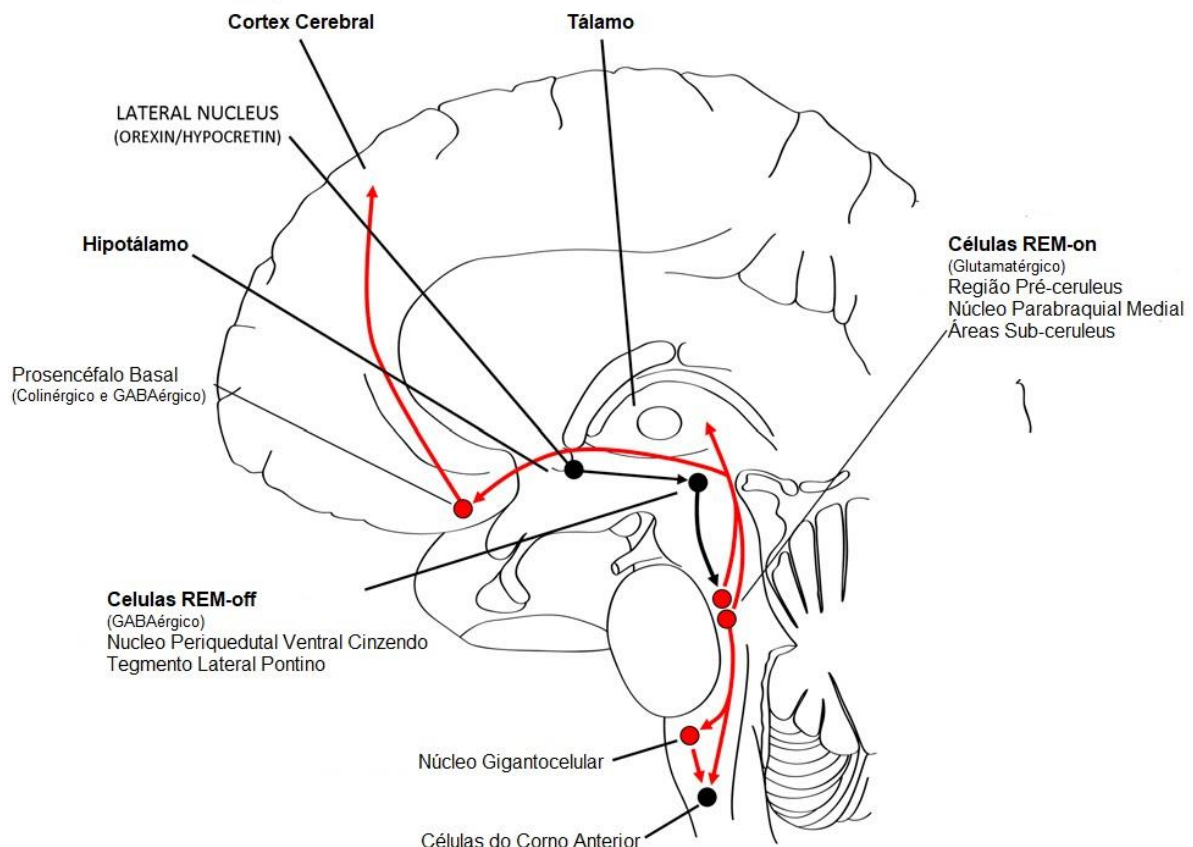


Figura 4: Representação do cérebro em plano sagital mostra regiões promotoras do sono REM compreendem células sleep-on do hipotálamo e do prosencéfalo basal que se encontram ativas, bem como as glutamatérgicas do sublocus coeruleus (SLC REM-on neurons) que promovem atonia REM através de projeção caudal. O sistema colinérgico do tronco cerebral também está ativo e estimula as alças talamocorticais para gerar o EEG dessincronizado similar ao da vigília. Círculos e linhas pretas indicam núcleos e vias neuronais normalmente inibidos durante o sono REM enquanto linhas e círculos vermelhos indicam núcleos e vias ativados durante REM. Fonte: adaptado de Dyken et al. (2012)(33)

Pelo exposto, percebe-se a íntima relação entre sono e modulação autonômica, desta forma, situações ou patologias que interferem na arquitetura do sono podem predispor o indivíduo a alterações cardiovasculares e maior risco de morte (47). Na epilepsia, estas consequências podem ser mais acentuadas e predisponem o indivíduo à SUDEP.

Ainda sob o prisma da epilepsia, vários estudos vêm relacionando epilepsia e o sono (48). Nesse sentido, a fase do sono em que o paciente se encontra tem importância crucial para o desenvolvimento da crise. Durante o sono NREM existe



uma alta sincronização neuronal entre o tálamo e o córtex podendo ser um facilitador para o aparecimento das crises, uma vez que nesta fase há aumento da atividade epileptiforme. De forma contrária, a fase de sono REM parece ser supressora das crises (48). Além disso, a privação e fragmentação do sono aumentam a frequência das crises epilépticas (48,49).

Da mesma forma, a epilepsia interfere no sono. As epilepsias podem provocar fragmentação e privação do sono, de forma direta e indireta devido às crises noturnas e pelo o uso de drogas antiepiléticas que modificam o padrão do sono, respectivamente (50). Além disso, o sono basal na epilepsia é alterado. Em um estudo utilizando o modelo da PILO, foi verificado que os animais com epilepsia apresentavam maior quantidade de vigília e sono NREM durante a noite (51). O estudo clínico de Bazil (2003) mostrou que pacientes com epilepsia também apresentavam maior porcentagem de vigília em detrimento de NREM e REM (52).

### **1.5 Morte Súbita e Inesperada na Epilepsia**

As taxas de mortalidade em indivíduos com epilepsia são as mais elevadas quando comparadas ao restante da população. A forma mais comum de morte entre estes pacientes é a morte súbita que acontece em cerca de 7-17% dos indivíduos com epilepsia (53).

Por definição, a morte súbita e inesperada na epilepsia (SUDEP – *sudden unexpected death in epilepsy*) refere-se ao óbito que ocorre de forma não traumática, sem afogamento, podendo ter ou não relatos de crise com exceção do SE e os exames *post-mortem* não podem revelar causas traumáticas ou toxicológicas para morte (54).

Os fatores de risco relacionados à SUDEP incluem a refratariedade ao tratamento, presença de crises tônico-clônicas generalizadas, politerapia medicamentosa, idade entre 20 e 40 anos, tempo de epilepsia não controlada e temperaturas frias (55). Embora não se saiba a causa da SUDEP, cada vez mais tem-se demonstrado sua origem multifatorial. Dentre estes fatores estão alterações cardiovasculares, autonômicas, respiratórias e centrais (56).

Os mecanismos pelos quais estas alterações fisiológicas podem contribuir para a SUDEP ainda são alvos de investigações. Neste cenário, embora haja poucos relatos sobre SUDEP que avaliem respostas respiratórias durante as crises, tem sido

demonstrada a presença de reflexos respiratórios disfuncionais no período ictal e pós ictal (57).

Em casos de SUDEP presenciada, o padrão fatal predominante consistiu em crise tônico-clônica generalizada seguida de disfunção respiratória e cardíaca, provavelmente mediada centralmente, cujo desfecho incluiu casos de parada cardiorrespiratória (58). Dentre os casos de SUDEP, 87,5% ocorrem durante o sono (58). Desta forma, reforça-se a influência do estado do sono sobre o risco de SUDEP, seja por predispor a crises, seja por alterar a modulação autonômica. Ainda, distúrbios do sono como apneia obstrutiva do sono, contribuem para a fisiopatologia da SUDEP (58).

Em estudos clínicos, foram observadas depressão das respostas respiratórias no período pós-ictal, que poderiam levar à morte súbita (56,59,60). Este evento tem sido relacionado ao espalhamento da crise para regiões de controle da respiração, seguido por um período de supressão encefálica generalizada no período pós-ictal, reduzindo o controle respiratório neste período. Esta supressão pode acontecer pela depleção de neurotransmissores após a hiperativação neuronal, ou por hipóxia decorrente de apneias centrais ou obstrutivas que podem ocorrer no período pós-ictal (61). De fato, é comum os pacientes terminarem a crise em decúbito ventral, facilitando a obstrução da via aérea superior e, portanto, desencadeando um episódio de apneia obstrutiva (59,60). Este episódio pode ser fatal, devido à depressão de reflexos no período pós-ictal, dentre eles o de despertar (62,63) .

### **1.6 Controle respiratório e epilepsia**

Alguns núcleos são especialmente importantes para o controle respiratório, como: i) complexo Bötzinger (Botz), região que apresenta neurônios expiratórios e é considerada fundamental para a atividade expiratória passiva; ii) pré-Bötzinger (pré-Botz), centro gerador de atividade inspiratória; iii) porção rostral do grupo respiratório ventral (GRVr), que apresenta neurônios pré-motores inspiratórios e iv) porção caudal do grupo respiratório ventral (GRVc), o qual contém neurônios bulboespinhais expiratórios (64–68)

Juntamente com os grupamentos citados anteriormente um grupo de neurônios presentes no núcleo retrotrapezóide (RTN), localizado no bulbo, também tem sido

considerado importante no controle respiratório. Essa região contém neurônios envolvidos na quimiorrecepção central, na inspiração e expiração ativa. O NTS e o grupo respiratório dorsal (GRD), ambos localizados na porção dorsal do bulbo, também atuam no controle respiratório, principalmente recebendo aferências periféricas ou encefálicas para o centro respiratório (69–72).

Existem estudos relatando a participação de outros núcleos na atividade respiratória como por exemplo, os núcleos serotoninérgicos da Rafe localizados medialmente no tronco encefálico (73,74), grupamentos catecolaminérgicos pontinhos A5 e A6, núcleo fastigial do cerebelo e neurônios orexinérgicos do hipotálamo e RTN (75–78). Sendo assim, no período ictal e pós-ictal estes núcleos podem estar superativados ou inibidos, respectivamente, causando, assim dificuldades para despertar frente a alterações respiratórias (79,80). Sabe-se que neurônios serotoninérgicos estão relacionados ao despertar frente à hipercapnia, atuando via receptor 5HT2c e pacientes com epilepsia apresentam diminuição destes neurônios (81). Desta forma, os mecanismos reflexos para liberação de vias aéreas estão comprometidos durante o período pós-ictal e interictal, podendo levar à morte dos paciente por asfixia (62,63). A figura 5 mostra uma representação esquemática das áreas de controle respiratório e regiões de modulação respiratória.

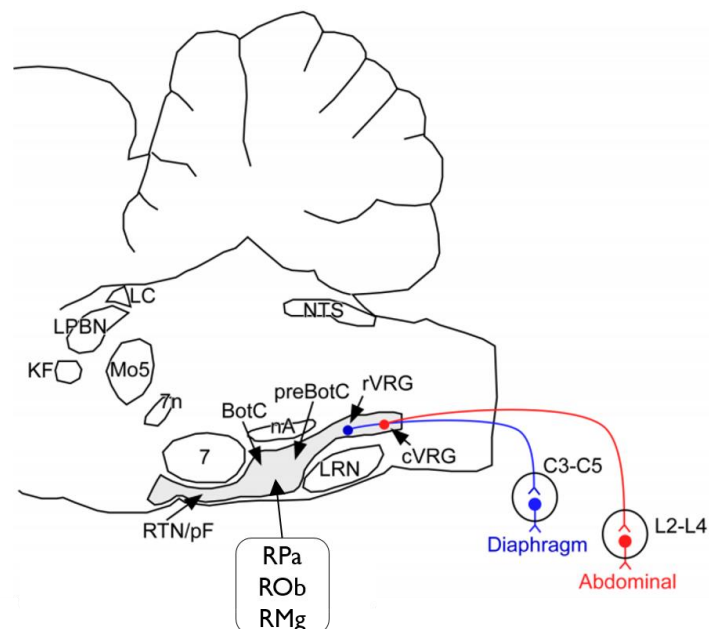


Figura 5: Desenho esquemático do tronco cerebral de roedores. Neuroanatomia do tronco cerebral por plano sagital mostrando a localização dos principais grupos respiratórios nos mamíferos. Abreviações: (7n) Núcleo Facial; (nA) Núcleo Ambíguo; (BotC) Complexo de Bötzing; (cVRG) Grupo Respiratório Ventrocaudal; (KF) Núcleo Kolliker-Fuse; (LRN) Núcleo Reticular Lateral; (Mo5) Núcleo Motor Trigeminal; (NTS) Núcleo do Trato Solitário; LPBN e LC formam o Núcleo Parabraquial; (preBotC) Complexo Pré-Bötzing; (vVRG) Grupo Respiratório Ventrorostral; (7) Nervo Facial; (RPa) Rafe Pallidus, (ROb) Rafe Obscuro; (RMg) Rafe Magnus. Fonte: Adaptado de Moreira et al. (2011)

A regulação de CO<sub>2</sub> e pH requerem um equilíbrio minucioso para regular a produção e excreção destes metabolitos, sendo assim um dos principais mecanismos desta regulação é o quimiorreflexo (82,83). Os quimiorreceptores centrais e periféricos controlam a respiração de forma involuntária por meio do reconhecimento da mudança na PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> e diminuição de pH, estes sinais são enviados aos centros respiratórios que integram estas informações no SNC e promovem regulação da ventilação através da ativação do nervo frênico controlando assim a contração diafragmática (69,82). Assim que as aferências dos quimiorreceptores periféricos são recebidas pelo NTS, o qual se comunica com a GRV, há modulação da resposta respiratória a partir do controle do complexo de pré-Bötzinger (84,85).

Os mecanismos e vias envolvidos na quimiorrecepção central ainda não estão bem elucidados. Estudos controversos ainda tentam esclarecer quais as regiões quimiossensíveis e de que forma ocorre a detecção de CO<sub>2</sub> e pH (86–88). Existem, de forma mais coesa, quatro teorias que buscam entender os mecanismos neuronais relacionados a quimiorrecepção central.

A primeira teoria diz que a quimiorrecepção central estaria distribuída em todo o SNC e vários neurônios estariam envolvidos neste mecanismo, dentre eles neurônios adrenérgicos e serotonérgicos, neurônios localizados na superfície ventrolateral do bulbo, neurônios localizados no NTS, além de neurônios da medula espinhal, do hipotálamo e algumas regiões do cerebelo (69,70,73). De acordo com estes estudos o a quimiorrecepção central seria resultado de um efeito da diminuição do pH que ativa estes neurônios influenciando o ritmo respiratório. Porém, estudos *in vitro* que tiveram início nos anos 60 demonstraram que o principal centro quimiorreceptor do SNC estava localizado na superfície ventrolateral do bulbo. Evidenciando que o bulbo apresenta importância significativa no controle deste reflexo (73,82).

A segunda teoria, chamada “teoria quimiorreceptora especializada” diz que em situação *in vivo* os neurônios responsáveis pelo ritmo respiratório recebem projeções de grupamentos especializados em detecção de variação de pH presentes em regiões estratégicas do tronco encefálico que seriam os quimiorreceptores centrais (69,73,83). O RTN tem sido atribuído como o principal quimiorreceptor central, principalmente em decorrência dos estudos relacionados à patofisiologia da Síndrome de Hipoventilação Congênita Central (SHCC). A SHCC é uma síndrome caracterizada por crises de apneia de origem central devido a disfunção do sistema autônomo (89). A

hipoventilação acentua-se durante o sono, em particular na fase NREM na qual o controle autonômico da respiração predomina (90).

As mutações no gene do fator de transcrição *paired-likehomeoboxgene-2b* (Phox2b) foi relacionada à causa da SHCC. O Phox2B é expresso em neurônios do RTN (89,91). A mutação deste gene em camundongos, reduz o número de neurônios no RTN e causa uma grave disfunção respiratória nos animais mutantes. Embora a SHCC gere completa perda da quimiorrecepção central, não afeta a respiração voluntária e regulação da respiração em exercícios físicos leves. Portanto, apesar de haver perda de quimiorrecepção os neurônios que geram ritmo respiratório funcionam de forma normal, demonstrando que neurônios responsáveis pelo ritmo respiratório são diferentes dos responsáveis pela quimiorrecepção central (92,93).

A terceira teoria diz que as células da glia também participam da quimiorrecepção central (70,87,88). De forma resumida esta teoria relata que os astrócitos seriam os primeiros a reconhecer a alteração química e ativariam neurônios do RTN promovendo aumento da ventilação. Esta teoria ainda é relativamente recente e algumas pesquisas ainda tentam desvendar a real participação da glia nesta resposta (88).

E por último, a quarta hipótese coloca os neurônios serotoninérgicos presentes nos núcleos da Rafe como possíveis quimiorreceptores centrais. A serotonina é um importante neuromodulador capaz de regular a excitabilidade dos neurônios respiratórios e modificar o funcionamento da rede neuronal respiratória (67,86). Além de serem sensíveis a variação de CO<sub>2</sub> e pH, evidências mostraram que a inibição dos neurônios serotoninérgicos da Rafe atenua as respostas ventilatórias à hipercapnia, dando suporte ao conceito de que estes neurônios seriam quimiorreceptores centrais e contribuiriam para as respostas ventilatórias reflexas (67,86).

De fato, tanto em paciente quanto em modelos experimentais demonstraram a redução de neurônios serotoninérgicos na epilepsia (95). Esta redução pode estar relacionada com uma possível causa de SUDEP. Além da alteração provocada pela perda de neurônios serotoninérgicos no controle da respiração, estudos apontam que a redução destes neurônios também facilita o aparecimento das crises (95,96).

Os estudos epidemiológicos demonstram que a maioria dos casos de SUDEP ou quase-SUDEP (casos em que o paciente desenvolveria para morte, mas que foi submetido a procedimentos de reanimação, evitando este desfecho) ocorrem após uma crise tônico-clônica generalizada e frequentemente durante o sono (52). Nos

casos em que se analisaram a posição corporal, a maioria dos pacientes se encontrava na posição de decúbito ventral (58,97). Estes achados, reforçam a teoria de que a disfunção na quimiorrecepção e nos mecanismos de despertar estão envolvidos na gênese da SUDEP. Neste cenário, a supervisão noturna, com a presença no quarto de um indivíduo com inteligência normal e mínimo de 10 anos de idade ou cama com sensores que alarmam quando detectam crise reduz o risco de SUDEP, pois impede que o paciente fique em posição que obstrua as vias respiratórias.

### **1.7 Apneia obstrutiva do sono e epilepsia**

A prevalência da síndrome da apneia-hipopneia obstrutiva do sono (SAHOS), na qual a apneia obstrutiva do sono (AOS) está inserida, varia de acordo com a população estudada. O estudo de Young et al. de 1993 mostrou que 9% das mulheres e 24% dos homens estudados apresentam a síndrome. Outros estudos utilizando pacientes com epilepsia mostraram que a AOS está presente em até 63% dos casos estudados, sendo que os maiores índices dizem respeito a pacientes com epilepsia refratária ao tratamento (98–100). Sendo assim, a AOS juntamente com as alterações respiratórias ictais e pós-ictais, são fatores relacionados à gênese da SUDEP.

Segundo a Academia Americana de Medicina do sono (AAMS) a SAHOS, é uma condição caracterizada por perturbação no padrão normal de respiração durante o sono com episódios recorrentes de apneia (obstrução total da via aérea) e hipopneia (obstrução parcial da via aérea) prejudicando o fluxo de ar por um período mínimo de 10 segundos (101). Durante a SAHOS a ventilação alveolar fica prejudicada o que resulta em dessaturação da hemoglobina ( $\geq 4\%$ , mesmo que a saturação basal se mantenha acima de 90%) causando hipóxia e aumento da pressão parcial de  $\text{CO}_2$ . A hipóxia e hipercapnia, por sua vez, ativam quimiorreceptores centrais e periféricos, que aumentam o esforço respiratório, promovendo o despertar (102,103). A presença de episódios de apneias/hipopneias durante o sono pode estar acompanhada de sintomas como roncos e agitação noturna (104,105). Esta síndrome pode ser classificada de acordo com o índice de apneia e hipopneia (IAH), podendo ser moderada ( $\text{IAH} \geq 5$  e  $\leq 15$ ), moderada ( $\text{IAH} > 15$  e  $\leq 30$ ) ou grave ( $\text{IAH} > 30$ ). Estão entre fatores de risco para SAHOS a obesidade, sexo masculino, idade avançada e comprometimento das estruturas crânio-faciais (105,106).

Os microdespertares noturnos decorrentes dos eventos obstrutivos causam fragmentação do sono e, portanto, pacientes com AOS apresentam vários prejuízos decorrentes da má qualidade do sono como sonolência diurna excessiva, fadiga diurna, dificuldade de concentração, cefaleia, irritabilidade, entre outros (107). Além de consequências cognitivas relacionadas ao sono prejudicado, a AOS está ligada a doenças cardiovasculares e metabólicas como hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, dislipidemias e outros (108,109).

Sabe-se também que a AOS aumenta a suscetibilidade às crises epiléticas (110). Esta relação pode se dar pela fragmentação ou privação do sono, que possuem relação direta com o aumento do número de crises, como já abordado anteriormente (111,112). Um dos tratamentos para a AOS é o uso do CPAP (*continuous positive airway pressure*), um dispositivo de ventilação mecânica não invasiva que mantém uma pressão positiva nas vias aéreas, evitando seu colapso. Os pacientes com epilepsia e AOS tratados com CPAP apresentaram redução no número de crises (113), demonstrando, assim, que a AOS aumenta a susceptibilidade às crises.

Como exposto no tópico anterior, pacientes com epilepsia apresentam alterações nos mecanismos de despertar, principalmente no período pós-ictal. As alterações nestes mecanismos podem prejudicar a liberação das vias aéreas em caso de obstrução, aumentando assim a morte por asfixia. Desta forma, a AOS é um fator de risco relacionado à SUDEP. Além disso, a AOS pode relacionar-se com SUDEP de forma indireta, uma vez que esta promove alterações cardiovasculares, as quais também estão envolvidas nos mecanismos subjacentes à SUDEP.

Tendo em vista que na condição de epilepsia há comprometimento das vias relacionadas ao despertar e dos centros de controle cardiorrespiratório, levantamos a hipótese de que a AOS nos pacientes com epilepsia teria uma duração maior comparada à população geral, o que conferiria maior risco a estes pacientes. Desta forma, é pertinente a avaliação das características das apneias na epilepsia, não só no que tange à sua duração, mas também às suas respostas cardiovasculares e respiratórias e sobre a arquitetura do sono. Tais resultados poderiam contribuir para o maior esclarecimento da relação entre AOS e SUDEP, assim como para contribuir no desenvolvimento de medidas preventivas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Caracterizar o padrão de apneias obstrutivas no sono e vigília induzidas em ratos com epilepsia.

### **2.2 Objetivos específicos**

Comparar as seguintes variáveis entre os animais com epilepsia e controle:

- Sono basal e seus eventos respiratórios;
- Interferência das apneias induzidas durante o sono na arquitetura do ciclo sono-vigília;
- Padrão das apneias obstrutivas realizadas no sono REM e NREM;
- Respostas cardiorrespiratórias durante apneia obstrutiva em vigília e no sono REM e NREM;
- Resposta quimiorreflexa;
- Avaliar regiões de controle cardiorrespiratórios presentes no bulbo encefálico;



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Todos os protocolos utilizando animais neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG) (CEUA 028/2018).

Foram utilizados um total de 270 animais ratos da linhagem Wistar pesando inicialmente 240-280g, provenientes do Biotério Central da UFG. Os animais foram alocados no Biotério dos Departamentos de Ciências Fisiológicas e Farmacologia em grupos de no máximo 5 animais por caixa. Após a indução da epilepsia os mesmos foram transferidos para gaiolas transparentes, a fim de permitir o monitoramento das crises epiléticas. Os animais tiveram acesso livre à água e ração e foram mantidos em um ambiente controlado com ciclo claro/escuro de 12/12 horas (onde as luzes acendiam às 6:00 horas).

Os ratos foram distribuídos em dois grupos: grupo controle (Ct) e grupo epilepsia (Ep). Sendo que para o grupo controle foram utilizados os animais que passaram pela indução da epilepsia, mas que não entraram em estado epilético (*Status epilepticus* - SE).

#### 3.2 Indução da Epilepsia

A epilepsia foi induzida pelo modelo da PILO, de acordo com o procedimento descrito por Turski et al.(14). Resumidamente, os animais receberam PILO (340 mg/Kg, i.p.) para induzir o SE. Trinta minutos antes da administração de droga, receberam metil-escopolamina (1 mg/kg, i.p.) com a finalidade de reduzir os efeitos da estimulação colinérgica periférica. O SE foi bloqueado após 3 horas, pela administração de diazepam (10 mg/kg, i.p.). Todos os animais receberam 1 ml de solução salina estéril (NaCl 0,9%) via subcutânea para reidratação após o final do protocolo de indução da epilepsia. Após o período agudo de SE, os animais passaram por um período silencioso, no qual há ausência de crises. Em seguida, os animais começaram a apresentar crises espontâneas, que perduram durante toda a vida, caracterizando a fase crônica do modelo. A fim de verificar o início do período crônico, os animais foram submetidos a videomonitoramento logo após à indução do SE.

### **3.3 Monitoramento de crises**

Os animais que faziam parte do grupo epilepsia foram alojados em uma sala com monitoramento por vídeo após a indução. Estes animais foram filmados 24 horas por dia por câmera infravermelha VMD1010 D (Intelbras S/A, SC, Brasil) conectada a um gravador de vídeo digital HDCVI 1008 (Intelbras, S/A, SC, Brasil). As gravações foram analisadas e a partir da primeira crise epiléptica espontânea (caracterizando período crônico do modelo) aguardou-se 30 – 60 dias para a continuidade dos procedimentos experimentais. Os animais do grupo controle também permaneceram no mesmo ambiente e foram pareados ao grupo com epilepsia.

### **3.4 Procedimentos cirúrgicos**

Após 30 – 60 dias da primeira crise espontânea os animais passaram por procedimentos cirúrgicos para implante de eletrodos para registros de biopotenciais: eletroencefalograma (EEG), eletromiograma (EMG) e eletrocardiograma (ECG). Todos os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.) e tratados com antibiótico (pentabiótico – 100 mg/kg, s.c., dose única) e anti-inflamatório (Funixin – 2 mg/kg, s.c., por 3 dias) após o procedimento cirúrgico.

Os eletrodos de EEG foram implantados por meio de uma cirurgia estereotáxica, na qual dois parafusos de aço inoxidável foram fixados no osso frontal (coordenadas: AP +3 mm, ML + 1 mm, em relação ao bregma) e no osso temporal esquerdo (coordenadas: AP +4 mm, ML + 1 mm, em relação ao lâmbda) nestes parafusos foram fixados eletrodos monopolares de níquel-cromo. Os eletrodos para EMG foram constituídos de cabo inox (5lb) revestidos com nylon, exceto na região em contato com o músculo. Estes eletrodos foram transpassados no músculo trapézio, bilateralmente. Os sinais obtidos pelo EEG e EMG foram utilizados para estagiamento das fases do sono, o qual está descrito posteriormente.

Os eletrodos de ECG foram constituídos de cabo inox (5lb) revestidos com nylon exceto nas extremidades. Um eletrodo foi fixado no processo xifoide e outro inserido no mediastino, sendo fixado ao músculo esternocleidomastoideo. Todos os eletrodos (EEG, EMG e ECG) foram fixados a um único conector de saída e ancorados ao crânio por acrílico.

No mesmo ato cirúrgico foram implantados um balão traqueal (para indução das apneias) e um balão intratorácico (para registro do esforço respiratório), de acordo com o método descrito por Schoorlemmer et al.(114). O balão traqueal consiste em um tubo de poliuretano com 8 cm de comprimento com uma extremidade dilatada e obstruída por um nó. A região dilatada foi alojada dentro de um tubo de teflon de 6 mm, a fim de evitar estimulação de receptores traqueais de dor quando da inflação do balão. O balão foi colocado na traqueia do animal a partir da incisão de dois anéis traqueais, abaixo da glândula tireoide (figura 6 A-E). O balão intratorácico consiste em um tubo de poliuretano de 10 cm, obstruído e inflado em uma das extremidades (figura 6F). Este balão foi introduzido 2 cm na caixa torácica do animal, com auxílio de um cateter guia. Os dois balões foram fixados a um conector de saída formado por duas agulhas 23Gx1” acopladas a uma rede cirúrgica (Sefar Propyltex 12”x12”) que foi alojado no dorso do animal.

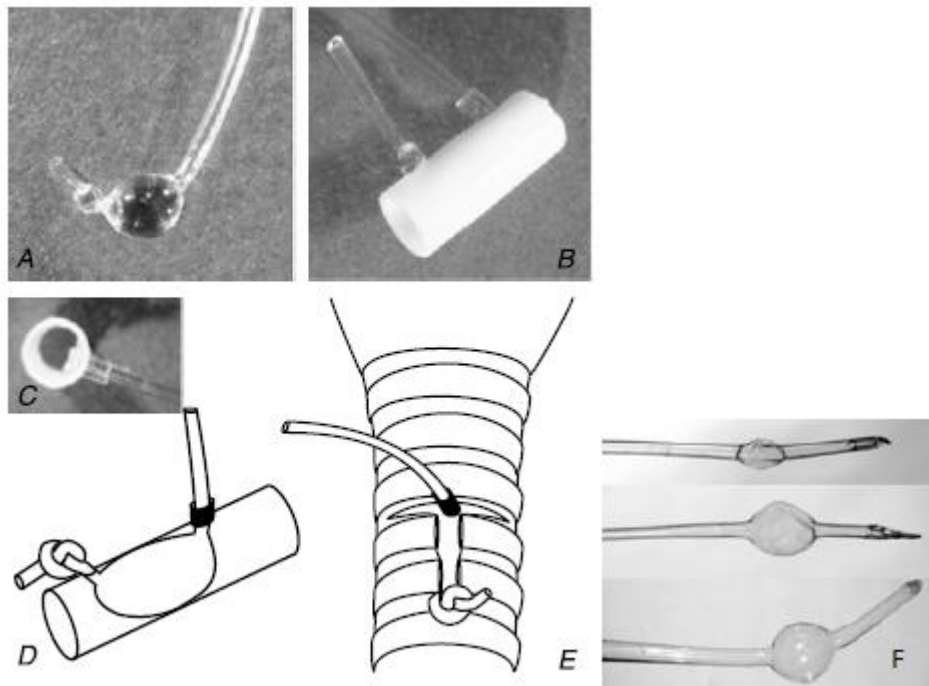


Figura 6: Construção e implantação de balão traqueal, um cateter de balão de poliuretano fechado com um nó e inflado com água (A). Cateter inserido em um tubo de Teflon (B). Tubo de Teflon com balão esvaziado (C). Diagrama esquemático do implante (D). Implante inserido na traqueia (E). Balão intratorácico (F). Fonte: Schoorlemmer et al 2011(115)

### 3.5 Registros

Os eletrodos para EEG, EMG e ECG foram conectados a amplificadores de sinal de biológico. Os cateteres do balão intratorácico foram conectados a transdutores de pressão. Os amplificadores e transdutores foram conectados a um sistema de aquisição de dados *PowerLab v8 (AD Instruments, Austrália)*. Os sinais foram visualizados e analisados pelo software *LabChart v.7.3.7 (AD Instruments, Austrália)*.

Durante 8h (9:00 – 17:00 h) do registro de sono basal, também foi registrada a pressão intratorácica para análise dos seguintes parâmetros respiratórios: número de suspiros, presença de apneias centrais (ausência de movimento respiratório por  $\geq 2$  s) espontâneas. Durante o período de apneias obstrutivas induzidas, foi avaliada a magnitude do esforço respiratório e a frequência cardíaca antes, durante e após a obstrução.

### 3.6 Detecção das fases do ciclo sono-vigília

Após uma semana de recuperação da cirurgia de implante dos eletrodos e dos balões, os animais foram registrados por 24 horas para análise do ciclo sono-vigília de cada animal. O estagiamento foi feito a partir da metodologia descrita por Louis et al. (22). As frequências do registro de EEG utilizadas para a classificação do sono foram  $\alpha$ : 10.5–15 Hz,  $\beta$ : 22–30 Hz,  $\gamma$ : 35–45 Hz,  $\delta$ : 1.5–6 Hz e  $\Theta$ : 6–10 Hz. De forma resumida, a classificação de cada fase do ciclo foi baseada em um algoritmo constituído por três etapas:

Etapa 1: quando a potência muscular estiver acima do limiar estipulado o animal se encontra em vigília, se a potência muscular estiver baixa o animal está em sono. Neste caso, passa-se para a próxima etapa;

Etapa 2: se a relação  $(\delta \times \alpha) / (\beta \times \gamma)$  estiver acima do limiar estipulado, foi classificado como sono NREM. Se estiver baixa, passa-se para próxima etapa;

Etapa 3: se a relação  $\Theta^2 / (\delta \times \alpha)$  estiver acima do limiar estipulado, foi classificado como sono REM. Se estiver baixa, vigília relaxada

A partir disso uma programação foi desenvolvida utilizando o programa LabChart para realizar o estagiamento do sono automaticamente com o intuito de realizar apneia em fases específicas do ciclo sono-vigília.

### 3.7 Indução das apneias durante o sono

A partir dos registos basais de 24 horas foram extraídos limiares dos espectros de potência de EMG, NREM e REM, respectivamente EMG-Power (amplitude do EMG), NREM-Power (razão entre  $(\delta \times \alpha)/(\beta \times \gamma)$ ) e REM-Power (razão entre  $\Theta 2/(\delta \times \alpha)$ ). Estes limiares foram utilizados para o estagiamento *online* do sono, conforme algoritmo descrito previamente. A partir deste estagiamento, o algoritmo foi programado para ativar a máquina de indução de apneia (figura 7), via um estímulo do PowerLab. A máquina de apneia utiliza um solenoide para inflar o balão traqueal, conforme descrito por Schoorlemmer et al. (114) Quando o software detecta aumento do sinal de EMG para o nível de vigília, o solenoide é desativado e o balão desinflado. Portanto, as apneias durante o sono não possuem duração fixa, mas dependem do tempo necessário para o animal despertar. Para as apneias em vigília, utilizamos o temporizador do próprio dispositivo, o qual permite a escolha do tempo da obstrução (que é fixo) e do intervalo entre elas.

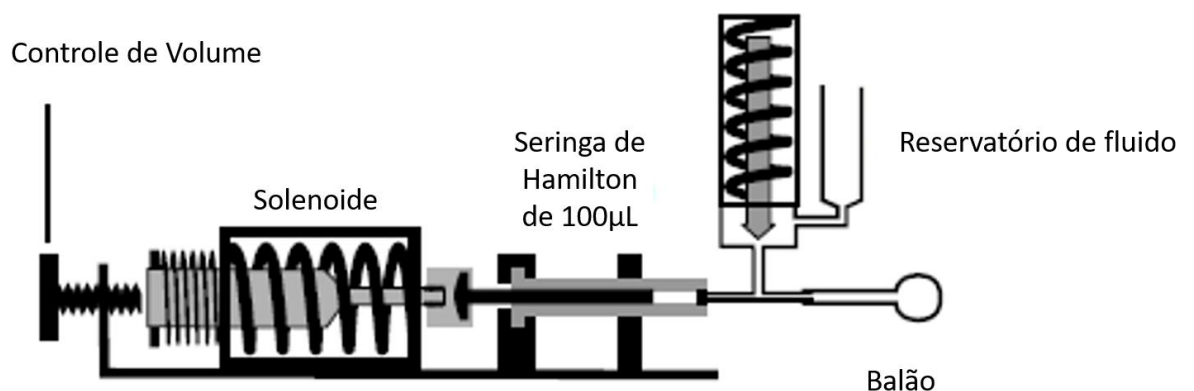


Figura 7: Diagrama esquemático do mecanismo de inflação do balão intratraqueal para indução da apneia obstrutiva. Neste mecanismo há um controlador de volume, um solenoide que empurra uma seringa de Hamilton preenchida com solução salina e conectada ao balão intratraqueal por meio de um tubo PE-20. Desta forma, quando a solenoide é ativada, injeta-se volume no balão, inflando-o; quando desativada, a seringa retorna à sua posição original desinflando o balão. Na máquina também há um reservatório de fluido para repor possíveis perdas de volume do balão. Adaptado de Schoorlemmer et al. (2011) (115)

Os animais permaneceram por um período de 8 horas (9:00 – 17:00 horas) para deflagração de apneias do sono. Estas apneias ocorreram exclusivamente no sono NREM ou no sono REM. Após o final das 8 horas foi feito um registro de 24 horas de sono de recuperação. Desta forma, por meio de sorteio, os animais recebiam apneias de acordo com uma fase específica do sono, seguida do registro do sono de recuperação. Após este período os animais permaneciam por mais 8 h de apneias na fase do sono não sorteada (NREM ou REM, dependendo do sorteio inicial), seguida novamente por registro de 24 h de sono de recuperação.

### **3.8. Implante de cânula arterial e venosa.**

Após dois dias do protocolo de apneia no sono os animais foram submetidos a implante de cânulas na artéria e veia femoral para registro de pressão arterial e administração de drogas respectivamente. Para isso uma incisão ventral na pata traseira esquerda foi realizada para exposição e dissecação do feixe vasculo-venoso femoral. Logo em seguida um tubo de polietileno PE-10 de 2 cm para veia e 5 cm para artéria foram introduzidos em cada vaso. Este tubo foi previamente soldado a outro tubo de polietileno PE-50 de 16 cm de comprimento e preenchido com solução salina estéril (NaCl 0,9%) heparinizada. As porções PE-50 foram exteriorizadas através de uma incisão realizada na região dorsal do pescoço, logo abaixo do conector previamente acoplado na mesma região, e obstruídas com pino de metal.

### **3.9 Apneias em vigília**

Vinte e quatro horas após a cirurgia para implante das cânulas, os animais foram submetidos a apneias em vigília. Estas apneias tiveram duração fixa de 6 e 10 segundos, pois estas são as durações médias das apneias deflagradas em NREM e REM, respectivamente, segundo trabalhos prévios do grupo (dados ainda não publicados). Foram feitas três apneias em cada tempo de duração, de forma aleatória.

### 3.9 Teste de quimiorreflexo

Trinta minutos após o período de apneias em vigília os animais passaram pelo teste de quimiorreflexo. O protocolo consistiu em infusão de 40µg/ml de KCN intravenoso, sendo avaliada a resposta da pressão arterial média, frequência cardíaca e esforço respiratório antes, durante e após o efeito da droga.

### 3.10 Perfusão e coleta de tecidos:

Após o final do protocolo de apneia em vigília os animais foram anestesiados profundamente com uretana (1,2 g/kg, i.p.) e submetidos à perfusão transcardíaca com solução de PBS 0,1 M (pH 7,4), seguida de solução de paraformaldeído 4% (pH 7,4). Após o final da perfusão o encéfalo foi coletado e pós-fixado em paraformaldeído 4%, por 3 dias. Em seguida foram criopreservados em solução de sacarose 30% e enviados ao professor colaborador Thiago Moreira da Universidade de São Paulo, para realizar as análises imunoistoquímicas da coluna respiratória

### 3.11 Imunoistoquímica

Os troncos encefálicos dos animais foram cortados na região do bulbo a uma espessura de 40µm. Foi selecionada uma fatia a cada 3 para a técnica de imunoistoquímica. Foram analisadas as seguintes regiões da coluna respiratória: RTN, Pré-Bötzing, Bötzing, Rafe magnus (RMg), Rafe obscurus (Rob) e Rafe pallidus (RPa).

Todos os tecidos foram previamente lavados em solução de PB 0,1M por 3 vezes durante 10 minutos, cada. Para a exposição do sítio ativo, os tecidos foram incubados durante 20 minutos em tampão de citrato de sódio 10mM em pH 6,0. Em seguida, encubados em NHS 5% (*normal horse serum*) com PBS 0,1M e triton 0,3% por 45 minutos.

Em seguida os tecidos foram encubados no anticorpo primário em PB 0,1M + 0,3% de triton + NHS 5% *overnight*. A concentração do anticorpo primário foi dependente do tipo de marcação desejada.

Para verificação de expressão de receptores nas regiões RTN, Bötzinger e Pré-Bötzinger foi utilizada a marcação com neurocinina-1 (NK1), utilizando anticorpo primário de coelho na diluição de 1:1000 (ALEXA 488) seguido de anticorpo secundário burro anti-coelho (ALEXA 594) na diluição de 1:500. Para análise de Phox2b em neurônios do RTN foi utilizado o anticorpo primário de coelho anti-Phox2b 1:100 (ALEXA 488), seguido de anticorpo secundário anti-coelho (ALEXA 594) também na diluição de 1:500. Para verificação de neurônios na Rafe foi utilizada a marcação de triptofano hidroxilase (TrpOH) utilizando o mesmo procedimento da marcação anterior.

Após a incubação com os anticorpos, os tecidos foram lavados 3 vezes por 10 minutos novamente em PB 0,1M e as lâminas foram montadas para posterior análise em microscópio de fluorescência.

A quantificação das marcações de Phox2b no RTN, assim como de TrpOH nos núcleos da Rafe foram feitos por contagem de neurônios totais marcados. Já as marcações de NK1 nos núcleos Bötzinger, pré-Bötzinger e no RTN foram analisadas através da densidade óptica.

### **3.12 Delineamento experimental**

A sequência de experimentos está representada na Figura 8. Os animais passaram por indução de epilepsia pela PILO, 30-60 dias após a primeira crise espontânea (início do período crônico) os animais passaram por cirurgia para implante de eletrodos para aquisição de biopotenciais e balões intratraqueal e intratorácico. Após uma semana de recuperação foi feito registro de sono basal. No dia seguinte foi induzida apneia em uma fase do sono (NREM ou REM, de acordo com sorteio) durante 8 horas, seguido de registro de sono de recuperação pós-apneia por 24 horas. Após isso, foi induzida apneia durante 8 horas na fase do sono que não foi sorteada no primeiro momento, seguida novamente por registro de sono de recuperação de 24 horas. Após o protocolo de apneia durante o sono foi realizado o protocolo de apneia em vigília com duração fixa de 6 s e 10 s. seguido do teste de quimiorreflexo. Após o final do protocolo os animais foram anestesiados, perfundidos e tecidos coletados para posterior análise imunoistoquímica



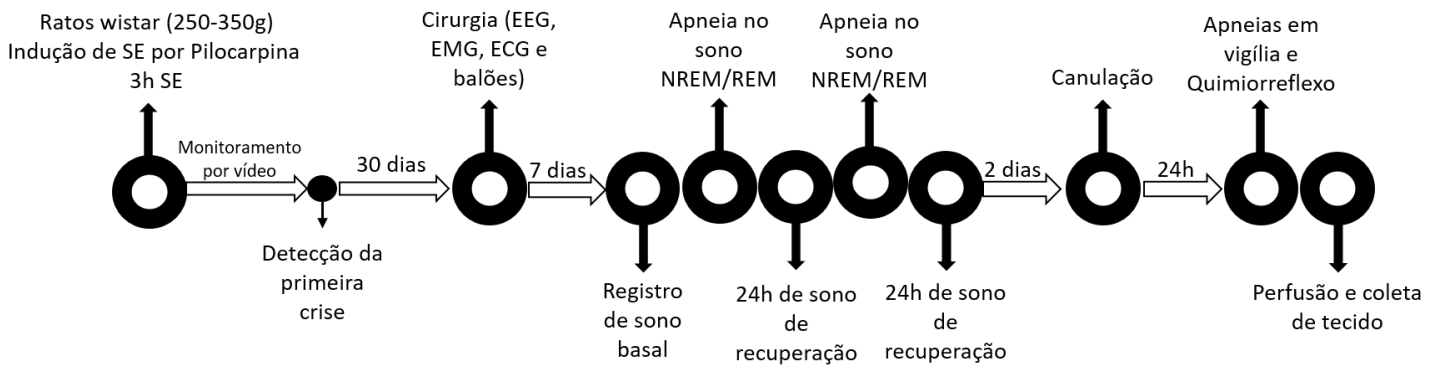


Figura 8: Delineamento experimental. Após 30 – 60 dias de período crônico os animais foram submetidos ao protocolo de apneia durante as fases específicas do ciclo sono-vigília.

### 3.11 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prism v.6.01 (Graph-Pad Software Inc., CA, EUA). As diferenças entre dois grupos foram determinadas utilizando-se o teste *t* de Student e Kolmogorov-Smirnov. Para comparar o efeito de múltiplos níveis de dois fatores com múltiplas observações em cada nível, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de Sidak. A significância estatística foi estabelecida para  $p < 0,05$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

#### 4. RESULTADOS

Todos os animais deste estudo passaram pela administração de Pilocarpina. A taxa de sucesso na indução de SE foi de 25% e a taxa de resistência dos animais ao modelo foi de 42%. Todos os animais resistentes ao SE não manifestaram crises espontâneas durante todo o protocolo experimental. Por outro lado, todos os animais que entraram em SE apresentaram crises espontâneas. Após 30 – 60 dias do início do período crônico do modelo, os animais passaram por cirurgia para implante de eletrodos de EEG e EMG para estagiamento e análise do sono.

As figuras 9, 10 e 11 apresentam traçado típico de Vigília, NREM e REM respectivamente. Nelas também estão representados o EMG Power, NREM Power e REM Power, cujos limiares estão representados pela faixa cinza.

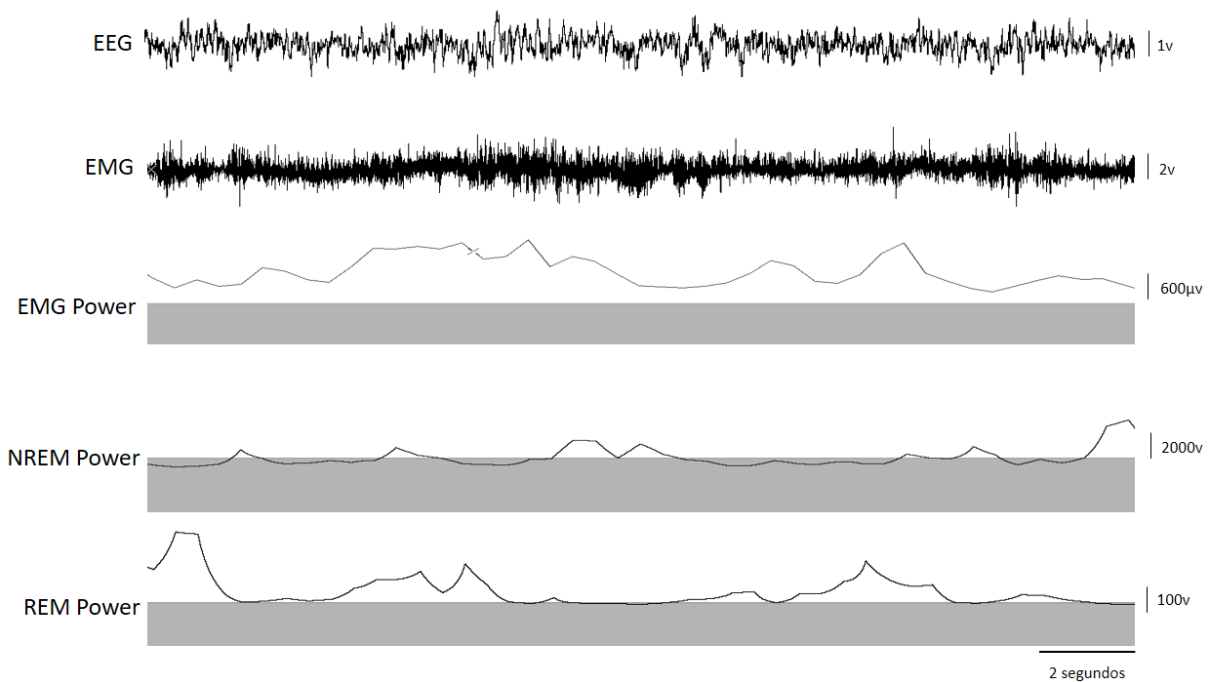


Figura 9: Representação esquemática de registro de Vigília. Traçados típicos de EEG, EMG, EMG Power, NREM Power e REM Power. EMG Power indica a amplitude do EMG, enquanto o NREM Power e REM Power indicam as razões entre ondas do EEG ( $\delta \times \alpha$ ) / ( $\beta \times \gamma$ ) e  $\Theta^2$  / ( $\delta \times \alpha$ ), respectivamente. A faixa cinza representa o limiar.

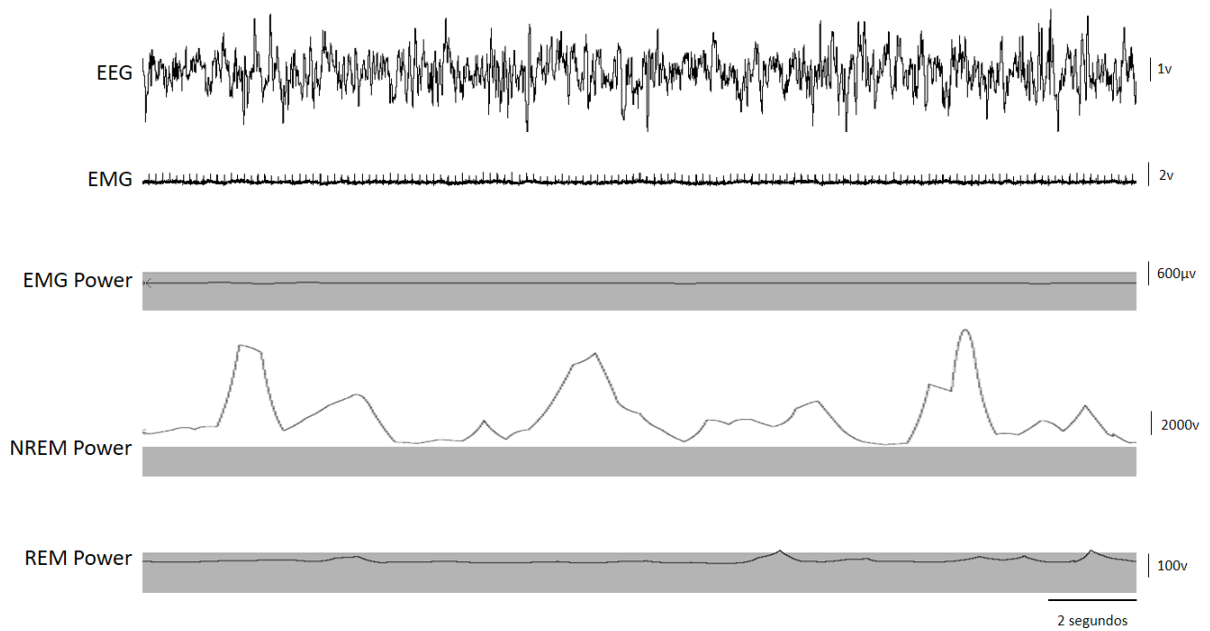


Figura 10: Representação esquemática da fase NREM. Traçados típicos de EEG, EMG, EMG Power, NREM Power e REM Power. EMG Power indica a amplitude do EMG, enquanto o NREM Power e REM Power indicam as razões entre ondas do EEG ( $\delta \times \alpha$ ) / ( $\beta \times \gamma$ ) e  $\Theta^2$  / ( $\delta \times \alpha$ ), respectivamente. A faixa cinza representa o limiar.

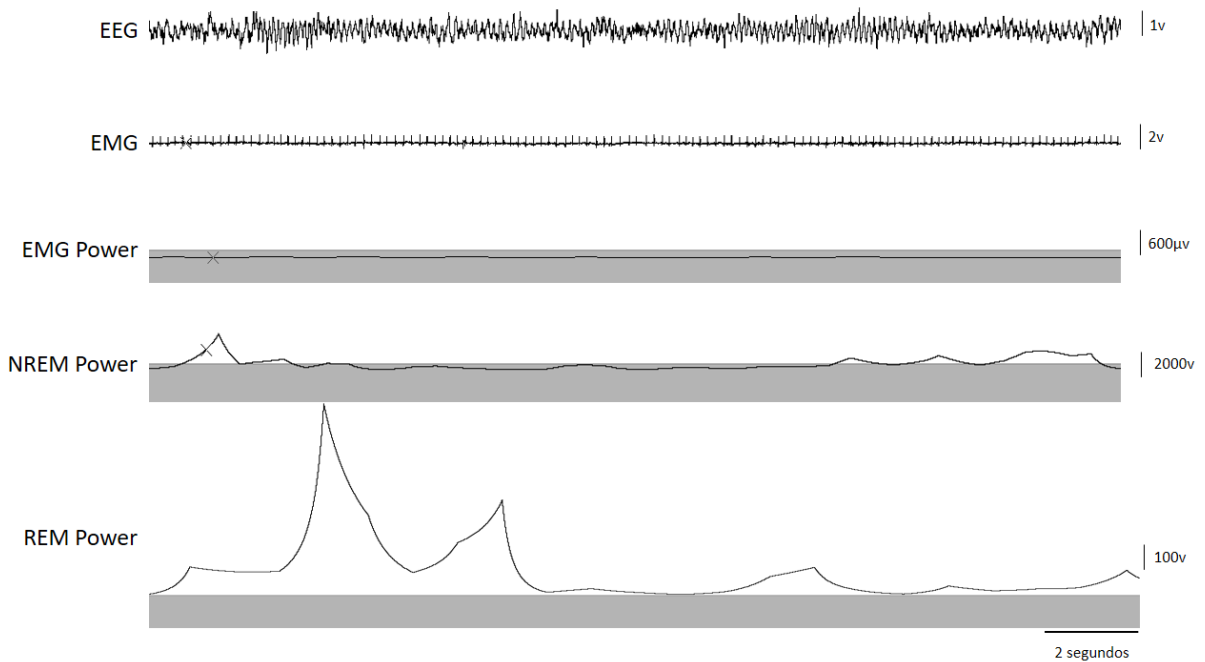


Figura 11: Representação esquemática da fase REM. Traçados típicos de EEG, EMG, EMG Power, NREM Power e REM Power. EMG Power indica a amplitude do EMG, enquanto o NREM Power e REM Power indicam as razões entre ondas do EEG ( $\delta \times \alpha$ ) / ( $\beta \times \gamma$ ) e  $\Theta^2$  / ( $\delta \times \alpha$ ), respectivamente. A faixa cinza representa o limiar.

#### 4.1 Parâmetros basais

A fim de verificar diferenças na fisiologia do sono entre os grupos, os animais tiveram o registro de sono durante 24 h, o qual também foi subdividido, para a análise, em 12h correspondentes às fases clara e escura do ciclo circadiano.

A fim de verificar alterações no sono basal dos animais com epilepsia analisamos a fração de sono 24 horas basal (figura 12A) demonstrou que os animais com epilepsia apresentaram diminuição da porcentagem de sono REM (Ct:  $10,80 \pm 0,82$  vs Ep:  $7,36 \pm 0,94$ ,  $p=0,02$ ), mas sem alterar as outras fases do ciclo. Quando analisados as fases clara e escura (figura 8B), os animais com epilepsia apresentaram aumento de vigília (Ct:  $47,30 \pm 3,18$  vs Ep:  $60,42 \pm 2,88$ ,  $p=0,01$ ) e diminuição de sono NREM (Ct:  $43,05 \pm 4,10$  vs Ep:  $32,61 \pm 1,92$ ,  $p=0,02$ ) somente na fase escura do ciclo, mas sem alteração na porcentagem de sono REM em nenhuma das duas fases (figura 12B).

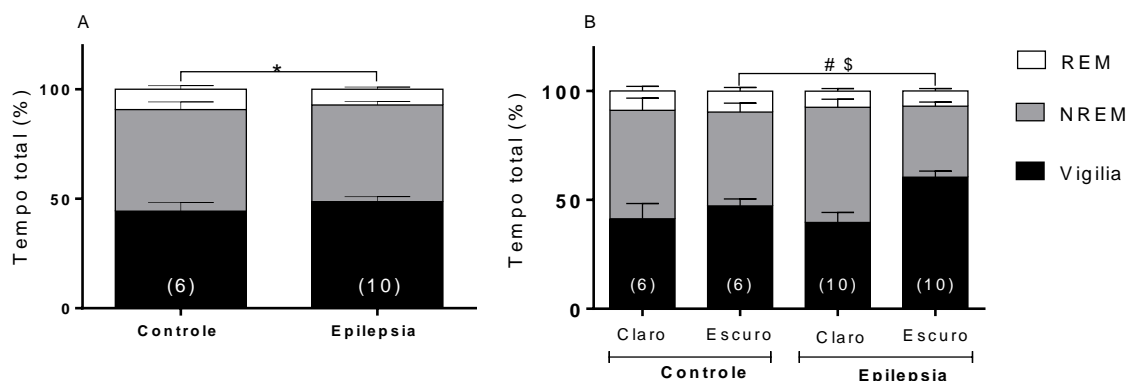


Figura 12: (A) Porcentagem ciclo sono-vigília durante 24 horas. (B) porcentagem do ciclo sono-vigília durante as 12h de claro e 12h de escuro. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM. Controle x Epilepsia. Teste T –Student. Número de animais por grupo representado entre parênteses. \*Comparado a REM do grupo controle,  $p<0,05$ . # NREM comparado com grupo controle,  $p<0,05$ . \$Vigília comparado com grupo controle,  $p<0,05$ .

O registro de EEG nas 24 horas do sono basal foi utilizado para análise do espectro de frequência das ondas do EEG nas diferentes fases do sono. Foram extraídas as porcentagens de ondas Delta ( $\delta$ : 1.5–6 Hz) e Theta ( $\theta$ : 6-10 Hz), as quais são mais frequentes no sono NREM e REM, respectivamente. As extrações foram de forma automatizada pelo LabChart v.7.3.7. Para isto, foi selecionado manualmente um trecho de 1 minuto do sono NREM ou REM. Foram extraídos 5 trechos de 1 minuto cada, para cada fase do sono.

Desta extração foi feita a relação entre as porcentagens de onda delta e theta tanto para parte clara (figura 13A) quanto para a parte escura do ciclo (figura 13B) para verificar possíveis alterações no EEG dos animais com epilepsia. Estes resultados demonstraram que os animais com epilepsia apresentam uma maior incidência de ondas delta, tanto em sono NREM (Claro: Ct  $1,82 \pm 0,07$  vs Ep  $2,62 \pm 0,17$ ,  $p=0,0001$ ; Escuro: Ct  $2,03 \pm 0,11$  vs Ep  $2,89 \pm 0,20$ ,  $p=0,0003$ ) quanto em sono REM (Claro: Ct:  $0,45 \pm 0,07$  vs Ep:  $1,12 \pm 0,08$ ,  $p=0,0013$ ; Escuro: Ct  $0,37 \pm 0,05$  vs Ep:  $1,15 \pm 0,12$ ,  $p=0,0012$ ) em ambos os períodos do ciclo claro e escuro.

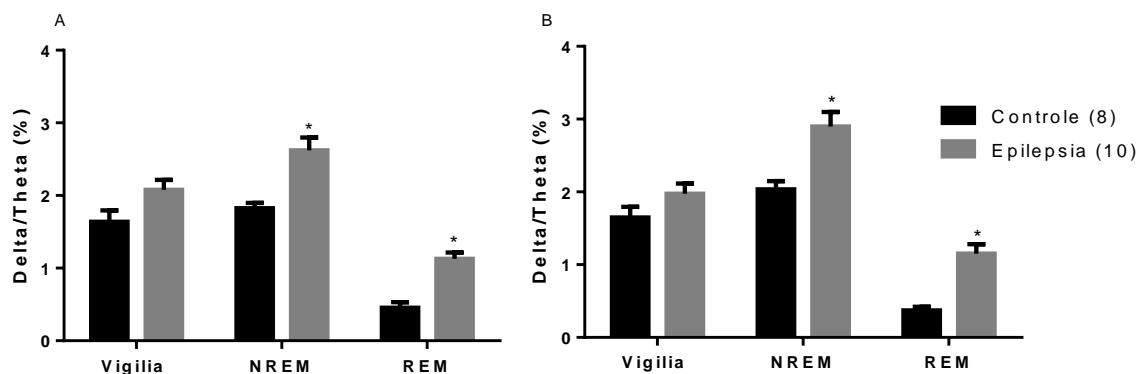


Figura 13: Razão entre onda delta e onda theta nas 12 horas correspondentes às fases clara (A) e escura (B). Resultados expressos em média  $\pm$  EPM. Controle vs Epilepsia. Teste T. Número de animais por grupo representado entre parênteses - Student \*  $p < 0,05$ .

Para verificar se os animais com epilepsia possuíam maior número de eventos respiratórios espontâneos (suspiros e apneia central do sono), os animais passaram por 8h do ciclo claro, com registro simultâneos de EEG/EMG e pressão intratorácica, para detecção de possíveis eventos respiratórios espontâneos no sono.

A figura 14A representa um traçado típico de suspiro. Foi considerado suspiro uma variação rápida e drástica da pressão intratorácica seguida de normalização dos movimentos respiratórios. As figuras 14B demonstra um traçado típico de apneia central do sono (ACS) espontânea. Foram consideradas ACS a ausência de movimentos respiratórios e AOS a presença de esforço respiratório durante um período maior ou igual a 2 segundos.

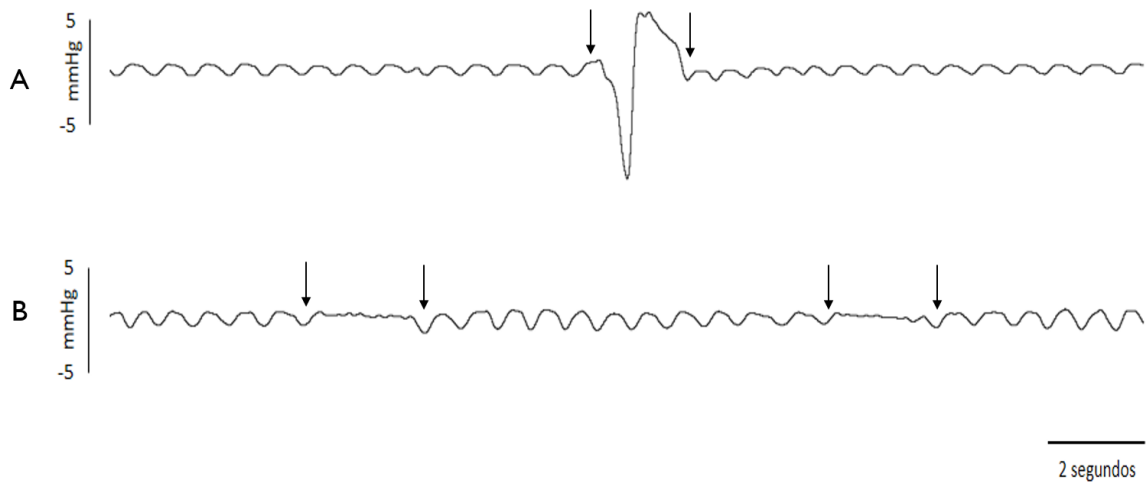


Figura 14: Traçados típicos de suspiro (a), apneia central do sono (b). Setas indicando o início e final de cada evento.

Todos os parâmetros analisados foram normalizados pelo tempo de registro (8h), sendo assim todos os dados estão expressos por hora. Não houve diferença na quantidade de suspiros durante o registro basal destes animais (figura15).

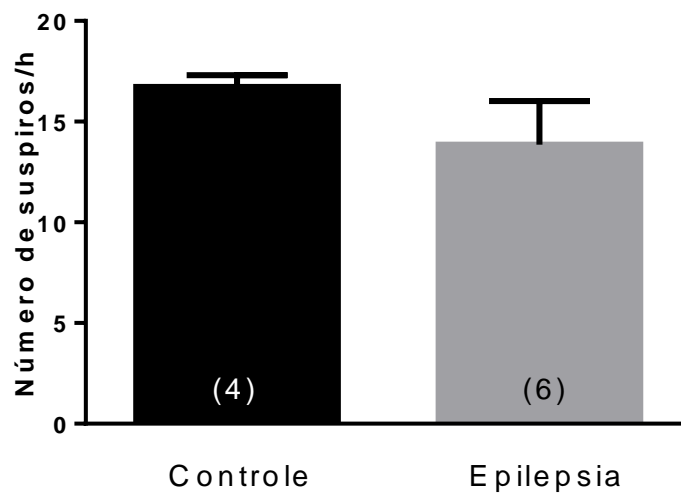


Figura 15: Quantidade de suspiros durante 8 horas de registro basal na fase clara do ciclo. Controle x epilepsia. Média ± EPM. Teste T-Student. Número de animais por grupo representado entre parênteses.

Quando analisamos as ACS/h que aconteceram de forma espontânea observamos que os animais com epilepsia apresentam um maior número destas apneias (Ct:1,71±0,34 vs Ep:3,60±0,48, p=0,01) (figura 16A), mas a média da duração não diferiu entre os grupos (Figura 16B).

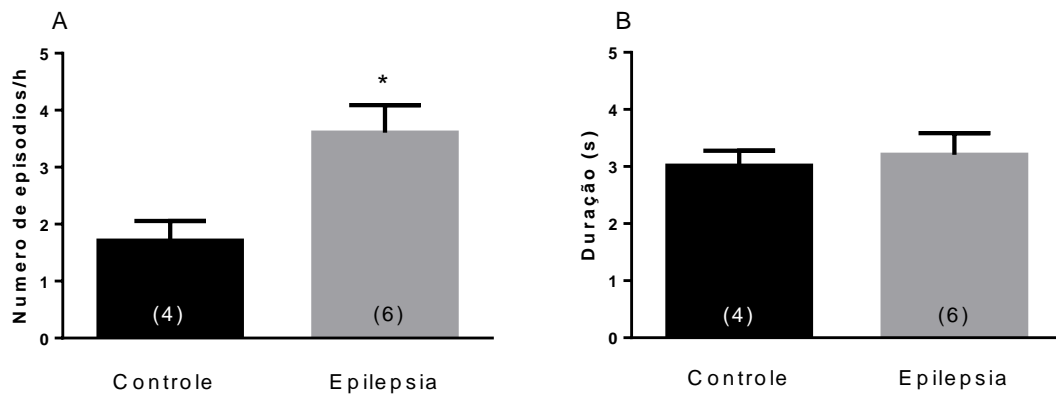


Figura 16: Número de apneias centrais (A) e duração de apneias centrais (B) durante 8 horas de registro basal na fase clara do ciclo. Controle x epilepsia. Média  $\pm$  EPM. Teste T-Student. Número de animais por grupo representado entre parênteses, \* $p < 0,05$

Quando observamos o total de eventos em relação à fase do sono, não foram encontradas diferenças na incidência das apneias centrais tanto em sono NREM quanto em sono REM (figura 17). Porém o grupo com epilepsia apresentou aumento não significativo do número de apneias em na fase REM.

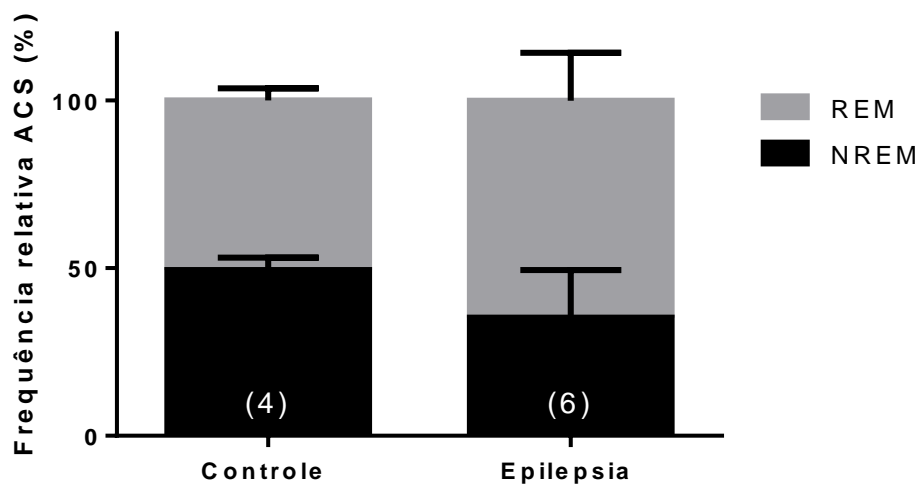


Figura 17: Distribuição das apneias centrais nas diferentes fases do sono. Média  $\pm$  EPM. Teste T-Student. Número de animais por grupo representado entre parênteses

## 4.2. Protocolo de apneias induzidas em sono

### 4.2.1. Efeito de 8h de apneia na fração do sono

Tendo em vista que no protocolo de apneias os animais apresentavam múltiplos despertares, para desobstruir as vias aéreas, verificamos se o este protocolo provocava privação ou restrição da fase em que a apneia acontecia. Para isso

comparamos as 8 horas de protocolo com o mesmo período do sono basal. Não observamos alteração na porcentagem de nenhuma das fases dos ciclo-sono vigília tanto para os protocolos de apneias induzidas em sono NREM (figura 18A) quanto em sono REM (figura 18B). Desta forma fica claro que apesar de o protocolo causar despertares por conta das apneias não houve privação de sono destes animais.

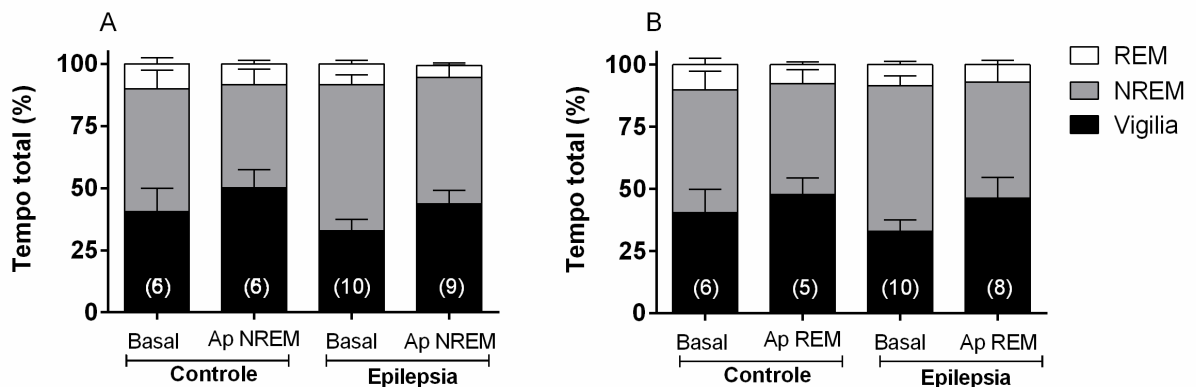


Figura 18: (A) Porcentagem do ciclo sono-vigília durante 8 horas de apneia em NREM. (B) porcentagem do ciclo sono-vigília durante 8h de apneia em REM. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM. Controle x Epilepsia. Teste T-Student \*  $p < 0,05$ .

Além da análise de sono basal também verificamos a influência do protocolo de indução de apneia sobre o sono de recuperação. Para isso, selecionamos as 8h subsequentes ao término do protocolo de apneias (colocar o horário) e comparamos com o mesmo período do sono basal, sem apneias.

Com estes resultados podemos verificar que, no grupo controle, tanto o protocolo de apneia em NREM (figura 19A), quanto em REM (figura 19B) não modificou o sono de recuperação. Em relação ao grupo com epilepsia, não houve alteração no sono de recuperação após apneias em NREM (Figura 19A), mas, de forma interessante, houve redução na porcentagem de sono REM no início do sono de recuperação após apneias em REM (Ct:  $8,30 \pm 1,17\%$  vs Ep:  $4,33 \pm 0,91\%$ ,  $p = 0,036$ , Figura 19B).



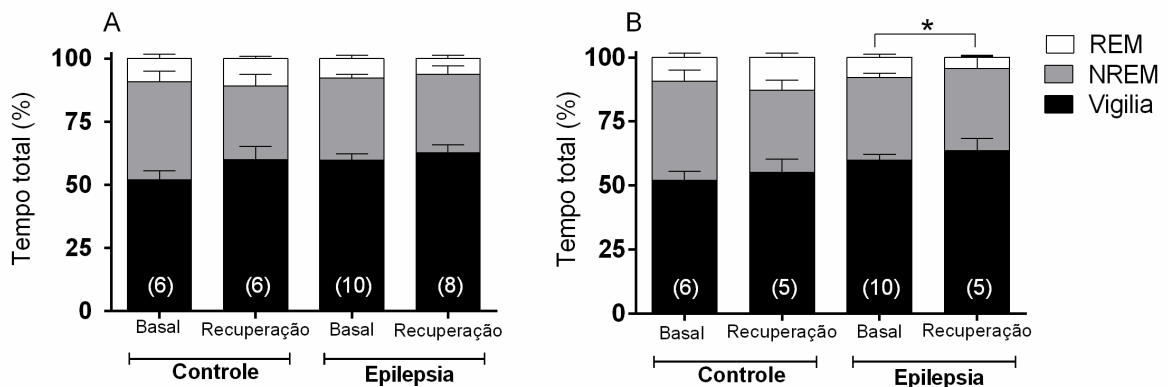


Figura 19: (A) Porcentagem de cada fase do ciclo sono-vigília durante 8 horas de sono basal comparado com 8 horas de sono de recuperação após apneias em sono NREM. (B) Porcentagem de cada fase do ciclo sono-vigília durante 8 horas de sono basal comparado com 8 horas de sono de recuperação após apneia em sono REM. Teste T-Student, \* $p < 0,05$

#### 4.2.2. Característica das apneias obstrutivas no sono NREM e REM

Tendo em vista que a indução de apneias dependia da entrada do animal na fase correspondente do sono e que o término das apneias dependia do retorno dos animais ao estado de vigília, tanto a frequência, quanto a duração das apneias foram variadas entre animais. Verificamos, portanto, se havia alteração nestes parâmetros entre os grupos experimentais.

No protocolo de apneias em NREM, foram deflagradas um total de 978 apneias nos animais controles e 1305 nos animais com epilepsia. No protocolo de apneias em REM foram deflagradas 498 apneias nos animais controle e 530 nos animais com epilepsia.

As características das apneias entre os grupos foram expressas como gráfico Box plot e Distribuição de Frequência Acumulada. No grupo controle, por meio do gráfico box plot, podemos averiguar que a duração de apneias em sono REM é maior quando comparada a NREM visto que tanto a mediana (NREM: 5,95 vs REM: 8,00) quanto a média (NREM:  $6,36 \pm 0,09s$  vs REM:  $8,24 \pm 0,15s$ ,  $p = 0,0001$ ) são maiores no sono REM (figura 20A). O gráfico de Distribuição de frequência acumulada corrobora estes resultados. Assim, vemos que a distribuição das apneias é diferente para as duas fases do sono no grupo controle. Além disso, observa-se que a probabilidade de se ter apneias com duração maior que 7 segundos é de 26,4% para NREM, enquanto para REM é de 56,7% (figura 20B).

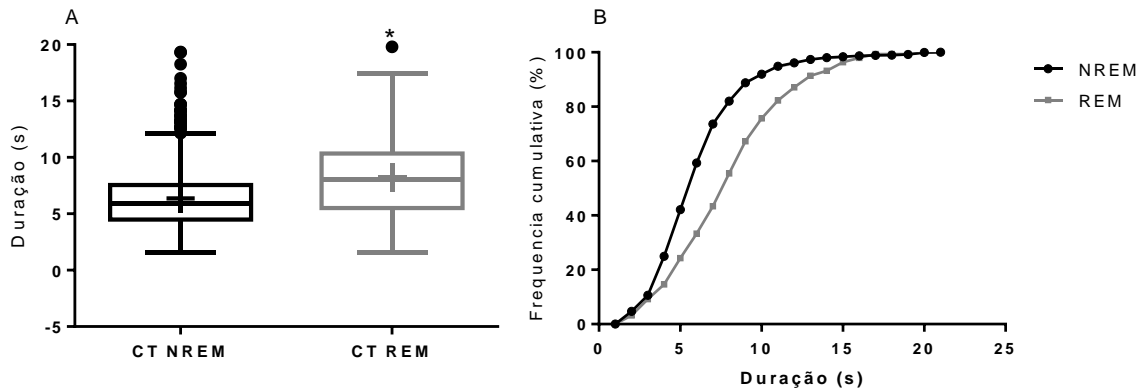


Figura 20: Distribuição das apneias deflagradas em sono NREM e REM para o grupo controle. Gráfico box plot (A) e gráfico de distribuição de frequência acumulada (B). NREM:978 eventos, 5 animais/REM: 498 eventos, 6 animais. Teste t-Student, Kolmogorov-Smirnov. \*  $p < 0,05$ . (+): média.

Quando fazemos a mesma análise para o grupo epilepsia não verificamos qualquer diferença na duração ou distribuição das apneias entre as fases do sono. Visto que não houve diferença na mediana (NREM: 7,0 vs REM: 7,37) e na média (NREM:  $7,03 \pm 0,07s$  vs REM:  $7,74 \pm 0,12s$ ,  $p = 0,1$ ) (figura 21A). Assim como as curvas apresentadas pela distribuição de frequência acumulada não apresentaram diferenças significativas (figura 21B). Portanto, no grupo com epilepsia não há diferenças na duração das apneias de acordo com a fase do sono.

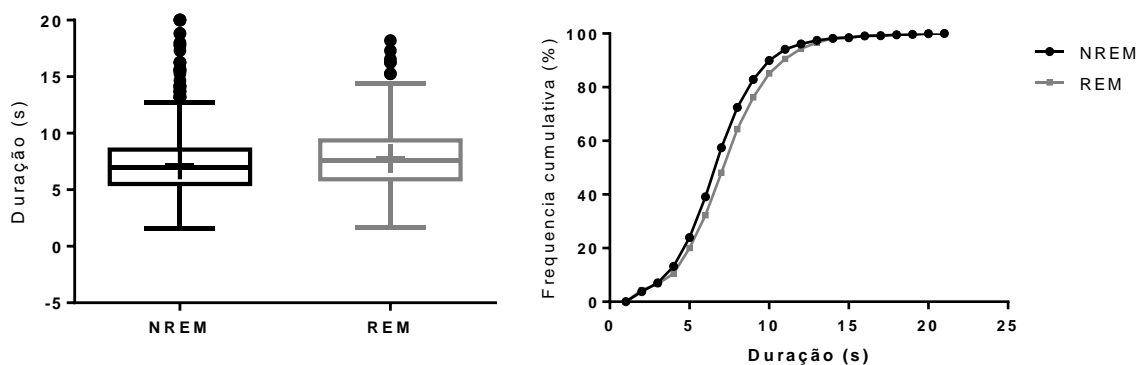


Figura 21: distribuição das apneias deflagradas em sono NREM e REM para o grupo epilepsia. Gráfico box plot (A) e gráfico de distribuição de frequência acumulada (B). NREM:1305 eventos, 9 animais/REM: 530 eventos, 7 animais. Teste t-Student, Kolmogorov-Smirnov. (+): média.

Fizemos também a comparação das diferentes fases do sono entre os dois grupos. Quando analisamos as apneias que aconteceram na fase NREM, observamos que a mediana (Ct: 5,95 vs Ep: 7,0) assim como a média (Ct:  $6,36 \pm 0,09$  vs Ep:

7,03±0,07,  $p=0,001$ ) da duração das apneias dos animais com epilepsia é maior quando comparados aos animais controle (figura 22A). A frequência acumulada mostrou que os animais com epilepsia apresentam maior probabilidade de terem apneias mais longas. Tomando como base apneias de 7 segundos, o grupo controle apresenta 26,4% de chances de terem apneias acima deste tempo, enquanto o grupo com epilepsia tem 42,6% (figura 22B).

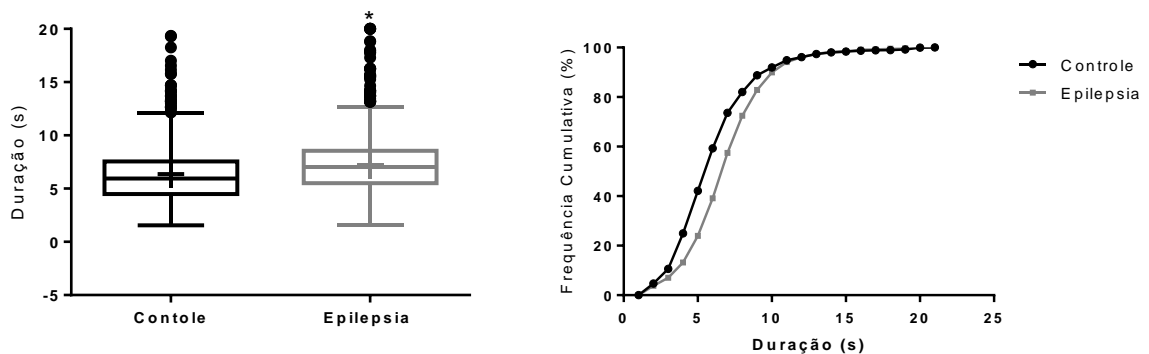


Figura 22: distribuição das apneias deflagradas em sono NREM Controle vs Epilepsia. Gráfico box plot (A) e gráfico de distribuição de frequência acumulada (B). Controle: 978 eventos, 5 animais/ Epilepsia: 1305 eventos, 9 animais. Teste t não paramétrico, Kolmorov-smirnov \*  $p<0,05$ . (+): média.

De forma interessante, quando analisamos estes parâmetros para a fase REM observamos que o grupo com epilepsia apresenta uma duração menor das apneias em relação ao grupo controle, tanto na mediana (Ct: 8,0 s vs Ep: 7,5 s), quanto na média (Ct: 8,2±0,15s vs Ep: 7,7±0,12s,  $p=0,004$ ) (figura 23A). Da mesma maneira, podemos averiguar que a frequência cumulativa dos animais com epilepsia aponta probabilidade menor de apresentarem apneias mais longas. Tomando como base apneias de 10 segundos, os animais controles têm 24,3% de chance de apresentarem apneias mais longas que este valor, enquanto para os animais com epilepsia essa probabilidade é de 14,9% (figura 23B).

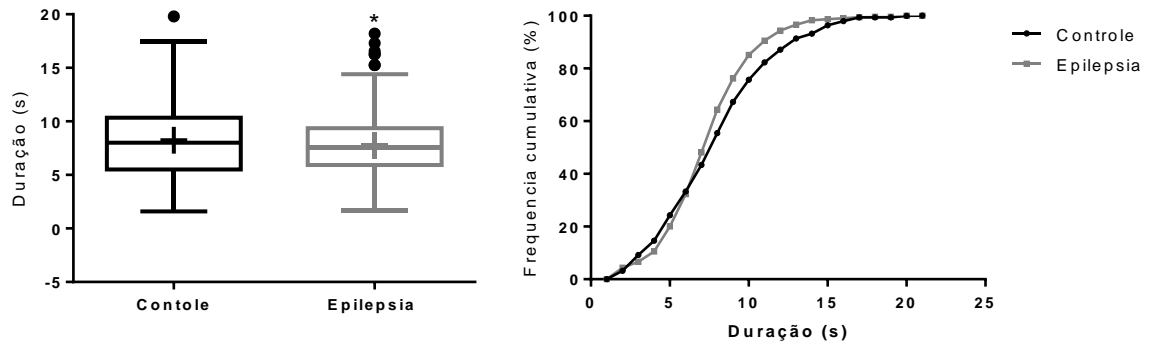


Figura 23: Distribuição das apneias deflagradas em sono REM Controle vs Epilepsia. Gráfico box plot (A) e gráfico de distribuição de frequência acumulada (B). Controle: 498 eventos, 6 animais/Epilepsia: 530 eventos, 7 animais. Teste t-Student, Kolmorov-smirnov \*  $p < 0,05$ . (+): média.

### 4.3 Parâmetros cardíacos e respiratórios durante as apneias obstrutivas durante a vigília e sono

Após o protocolo de apneias induzidas no sono, os animais foram submetidos à apneias em vigília com registro concomitante de ECG e esforço respiratório. As apneias foram deflagradas durante tempos fixos de 6 e 10 segundos.

Destes registros foram retirados dados de frequência cardíaca a partir do ECG e esforço respiratório a partir da pressão intratorácica. Foram extraídos os valores médios de cada segundo de cada parâmetro nos tempos: 10 segundos antes, durante o período de apneia e 40 segundos após seu término. Estes valores foram utilizados para calcular a variação da frequência cardíaca e da pressão intratorácica em relação ao período basal, para construção de gráfico temporal representativo. Também foram extraídos a variação máxima e mínima de cada parâmetro e a área sob a curva positiva e negativa durante e após a apneia.

Considerando que: a) as apneias do sono possuem duração aleatória, dependente do tempo necessário para despertar e b) foram realizadas apneias obstrutivas em vigília com duração fixa de 6s e 10s, para avaliar parâmetros cardiovasculares e respiratórios; foram selecionadas apenas as apneias do sono com durações de 6s e 10s para melhor comparação das respostas.

Durante as apneias de 6 segundos em vigília, houve bradicardia e aumento do esforço respiratório durante o momento da apneia. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nestes parâmetros entre os grupos, embora o esforço

respiratório pareça ser menos acentuado no grupo com epilepsia (figura 24 A e B e tabela 1). Durante o sono, a bradicardia foi significativamente atenuada em relação à vigília, tanto no sono NREM, quanto no sono REM nos ratos do grupo controle e epilepsia (Figura 24 e Tabela 1). O esforço respiratório foi reduzido somente nas apneias NREM, comparadas às apneias em vigília em ambos os grupos (Figura 24, tabela1). Além disso, o esforço máximo foi menor nas apneias em NREM comparadas as apneias em REM, em ambos os grupos. Não houve diferença na resposta bradicárdica e de esforço respiratório entre os grupos, embora o grupo epilepsia tenha tido uma tendência a ter menor esforço respiratório no sono REM.

Após o término das apneias em sono (NREM e REM) os animais de ambos os grupos apresentaram taquicardia significativa em relação às apneias em vigília. A magnitude desta taquicardia não foi diferente entre os grupos (figura 24 e tabela 1).

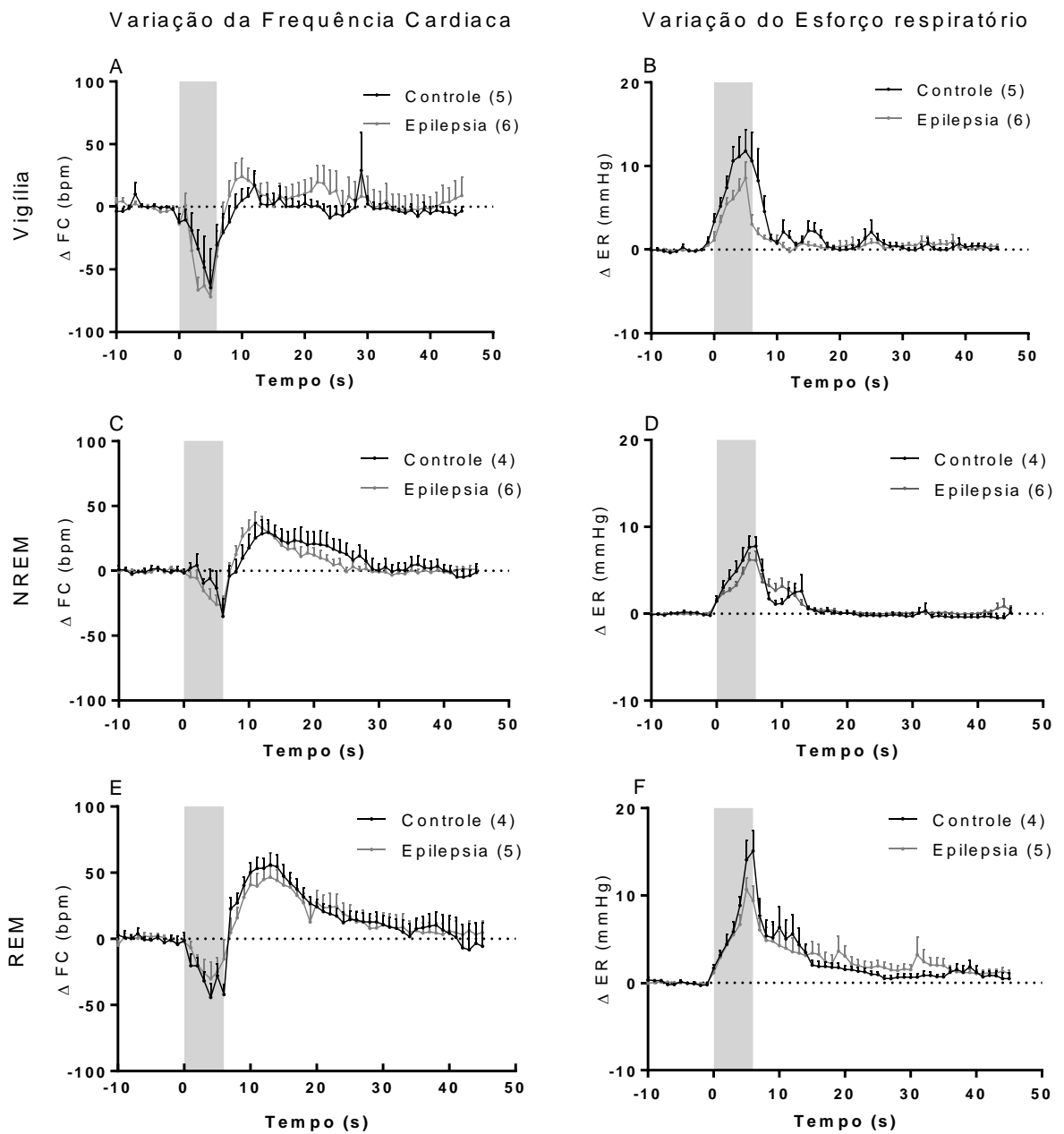


Figura 24: Frequência cardíaca (primeira coluna) e esforço respiratório (segunda coluna) em vigília (A e B), NREM (C e D) e REM (E e F) durante apneias de 6 segundos. Início da apneia é representado pelo tempo 0 e final da apneia representado pelo final da faixa cinza.

Tabela 1: Área sob a curva (AUC) e resposta máxima ( $\Delta$  máximo e  $\Delta$  mínimo) das respostas cardíacas e respiratórias durante e após apneia de 6 segundos em vigília, NREM e REM.

		Variação da Frequência Cardíaca				Variação do Esforço Respiratório	
		Apneia		Pós-apneia		Apneia	
		AUC negativa	$\Delta$ mínimo	AUC positiva	$\Delta$ máximo	AUC positiva	$\Delta$ máximo
<b>Vigília</b>	Controle (n=5)	204,20 $\pm$ 92,33	-41,59 $\pm$ 10,91	215,7 $\pm$ 90,15	23,35 $\pm$ 6,78	53,17 $\pm$ 9,66	14,12 $\pm$ 2,49
	Epilepsia (n=6)	275,60 $\pm$ 62,96	-103,7 $\pm$ 22,89	608,60 $\pm$ 329,01	52,28 $\pm$ 10,69	35,81 $\pm$ 5,91	9,21 $\pm$ 1,71
<b>NREM</b>	Controle (n=4)	62,96 $\pm$ 31,51*	-39,43 $\pm$ 12,62*	499,90 $\pm$ 236,30*	36,27 $\pm$ 8,91	34,61 $\pm$ 6,63*	8,21 $\pm$ 1,20*
	Epilepsia (n=6)	93,41 $\pm$ 25,06*	-32,23 $\pm$ 5,87*	1059,00 $\pm$ 386,90*	45,66 $\pm$ 5,26	35,17 $\pm$ 10,77	7,24 $\pm$ 1,23
<b>REM</b>	Controle (n=4)	175,30 $\pm$ 17,70**	-62,65 $\pm$ 3,91*	889,90 $\pm$ 243,30**	60,74 $\pm$ 9,33**	44,77 $\pm$ 5,7	16,46 $\pm$ 2,73#
	Epilepsia (n=5)	149,00 $\pm$ 48,06**	-40,98 $\pm$ 12,24*	920,90 $\pm$ 207,40*	60,88 $\pm$ 6,18	35,46 $\pm$ 4,29	11,57 $\pm$ 1,25#

Média  $\pm$  EPM. Two way ANOVA. \* diferente de vigília,  $p < 0,05$ ; # diferente de NREM,  $p < 0,05$

As respostas durante apneia de 10 segundos foram semelhantes às encontradas nas apneias de 6 segundos, porém com maior magnitude. Neste sentido, durante a vigília houve uma intensa bradicardia e grande esforço respiratório durante a apneia, seguida de normalização após seu término. Não houve diferença estatística em qualquer dos parâmetros entre os dois grupos, embora o grupo com epilepsia teve um padrão de menor esforço respiratório (figura 25 A e B e tabela 2).

Durante as apneias que aconteceram no sono NREM e REM, a bradicardia foi atenuada em relação à vigília, porém foi seguida de taquicardia após o término da apneia (Tabela 2). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 25 C e E e tabela 2). O esforço respiratório durante apneias no sono (NREM e REM) foi menor comparado à vigília no grupo controle (figura 25 D e F e tabela 2). No entanto, esta diferença não foi encontrada no grupo com epilepsia, justamente pelo esforço respiratório deste grupo ser menor durante as apneias em vigília, comparado com o grupo controle. Os grupos não diferiram na intensidade do esforço respiratório durante as apneias em fases específicas do sono.



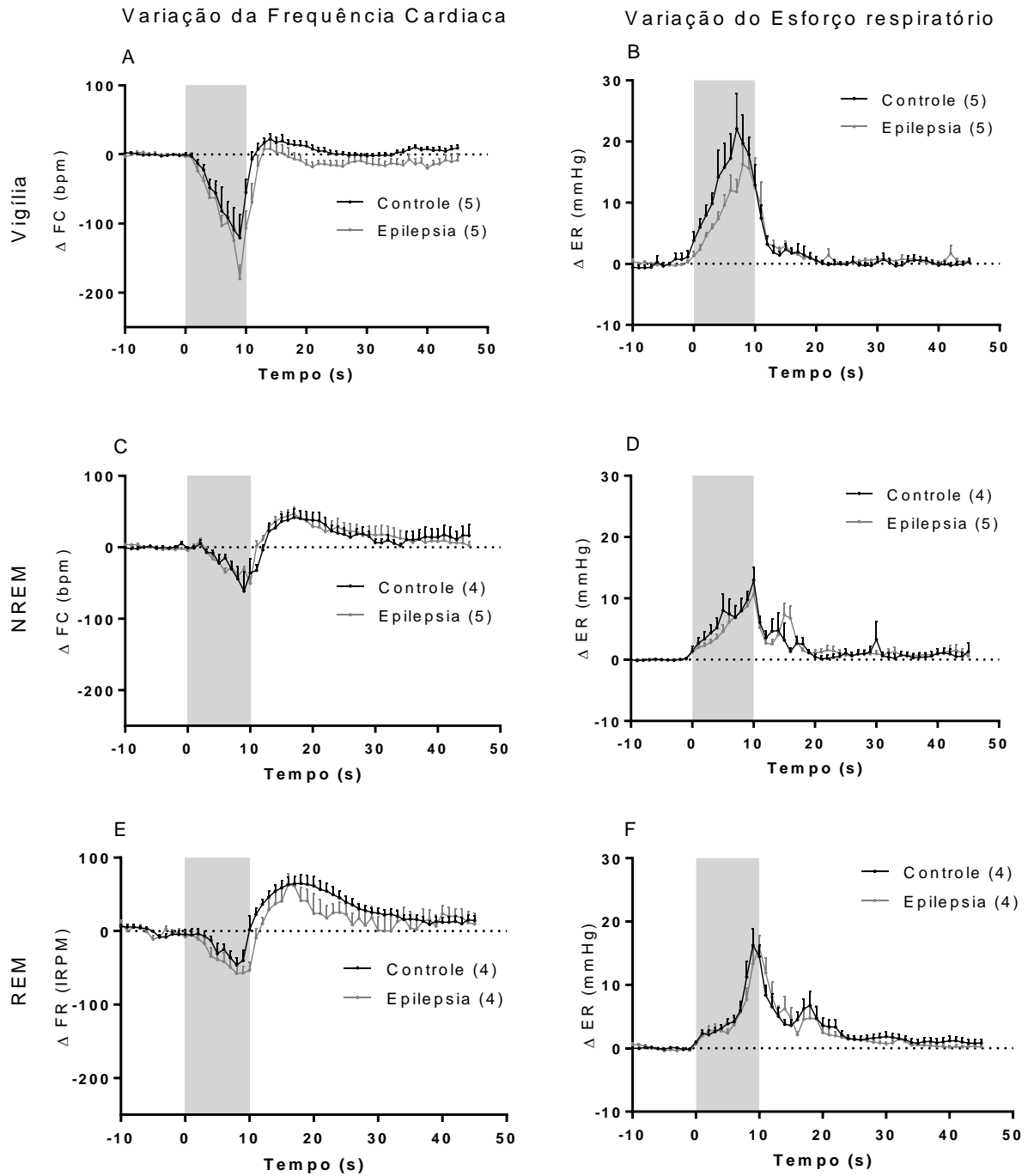


Figura 25: Frequência cardíaca (primeira coluna) e esforço respiratório (segunda coluna) em vigília (A e B), NREM (C e D) e REM (E e F) durante apneias de 10 segundos. Início da apneia é representado pelo tempo zero e final da apneia representado pelo final da faixa cinza

Tabela 2: Área sob a curva (AUC) e resposta máxima ( $\Delta$  máximo e  $\Delta$  mínimo) das respostas cardíacas e respiratórias durante e após apneia de 10 segundos em vigília, NREM e REM.

		Variação da Frequência Cardíaca				Variação do Esforço Respiratório	
		Apneia		Pós-apneia		Apneia	
		AUC negativa	$\Delta$ mínimo	AUC positiva	$\Delta$ máximo	AUC positiva	$\Delta$ máximo
<b>Vigília</b>	Controle (n=5)	496,60 $\pm$ 113,90	-150,30 $\pm$ 34,11	368,20 $\pm$ 101,50	33,40 $\pm$ 6,93	123,60 $\pm$ 27,61	26,15 $\pm$ 6,13
	Epilepsia (n=5)	553,6 $\pm$ 84,16	-186,70 $\pm$ 20,40	318,40 $\pm$ 142,70	30,34 $\pm$ 8,80	79,43 $\pm$ 13,67	16,50 $\pm$ 3,20
<b>NREM</b>	Controle (n=4)	212,40 $\pm$ 76,18*	-78,27 $\pm$ 17,80*	758,90 $\pm$ 295,80*	40,13 $\pm$ 11,00	63,10 $\pm$ 15,75*	13,89 $\pm$ 2,06*
	Epilepsia (n=5)	210,20 $\pm$ 25,09*	-62,68 $\pm$ 8,038*	820,10 $\pm$ 233,80*	57,09 $\pm$ 8,60*	50,99 $\pm$ 11,31	10,73 $\pm$ 2,40
<b>REM</b>	Controle (n=4)	228,00 $\pm$ 40,33*#	-78,86 $\pm$ 11,33*	1225,00 $\pm$ 211,20*#	62,91 $\pm$ 12,53*#	60,00 $\pm$ 9,52*	18,19 $\pm$ 2,40
	Epilepsia (n=4)	344,1 $\pm$ 68,16*#	-65,22 $\pm$ 9,82*	1059,00 $\pm$ 386,90*	86,00 $\pm$ 5,19*#	52,13 $\pm$ 9,26	17,78 $\pm$ 1,41

Média  $\pm$  EPM. Two way ANOVA, \* diferente de vigília,  $p < 0,05$ ; # diferente de NREM,  $p < 0,05$

#### 4.4. Quimiorreflexo

Os animais com epilepsia apresentaram menor pico de resposta pressórica frente ao KCN comparado aos animais controles (Ct:  $41,79 \pm 3,0$  vs Ep:  $29,64 \pm 4,0$ ,  $p=0,03$ ) (figura 26B). Porém a área sob a curva positiva (resposta pressórica) não foi diferente entre os grupos (Figura 26C). De forma interessante, os animais com epilepsia apresentaram hipotensão logo após o final da resposta pressórica, o que não ocorreu nos animais controles (Ct:  $2,57 \pm 1,70$  vs Ep:  $114,10 \pm 35,52$ ,  $p=0,005$ ) (Figura 26 A e D).

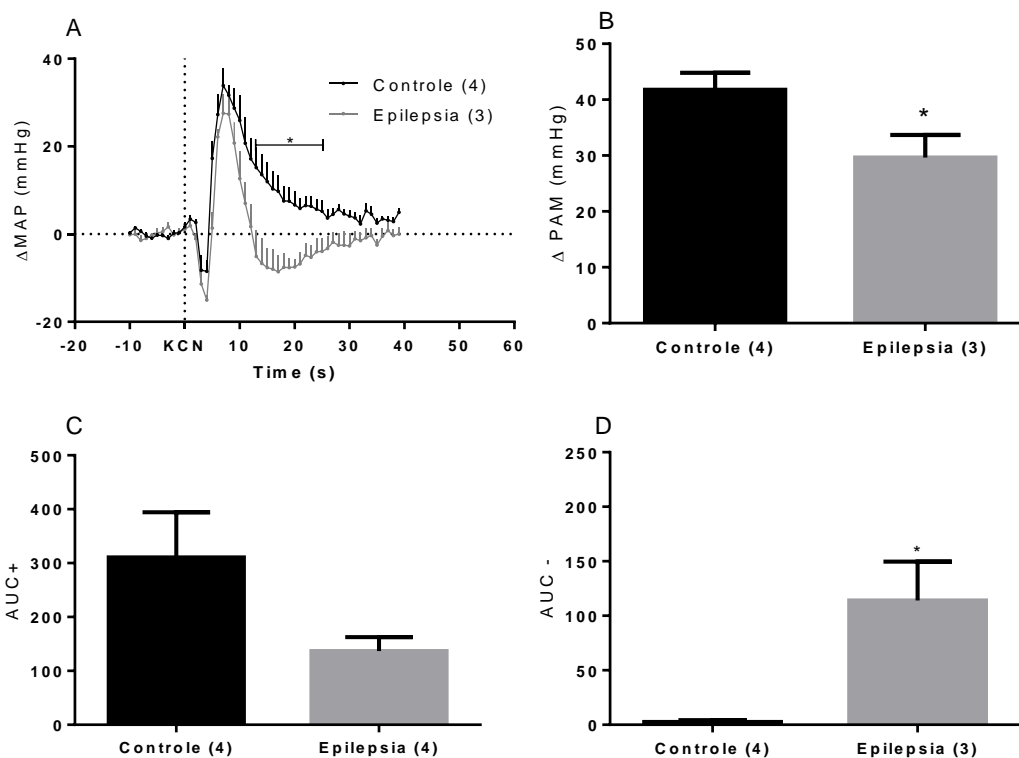


Figura 26: Variação da pressão arterial média frente à estimulação do quimiorreflexo. Gráfico temporal da média a cada segundo (A), resposta máxima (B), área sob a curva positiva durante a resposta (C), área sob a curva negativa pós-resposta (D). O início da resposta é representado pela linha tracejada, tempo zero indicado como KCN. Teste T-Student, \* $p < 0,05$ .

Quando analisamos a resposta de frequência cardíaca, os animais de ambos os grupos apresentaram bradicardia durante a ação do KCN e retornaram à frequência basal logo após (Figura 27A). Não houve qualquer diferença entre as respostas dos dois grupos tanto no que diz respeito à área sob a curva (Figura 27C) quanto à resposta máxima bradicárdica (Figura 27B).

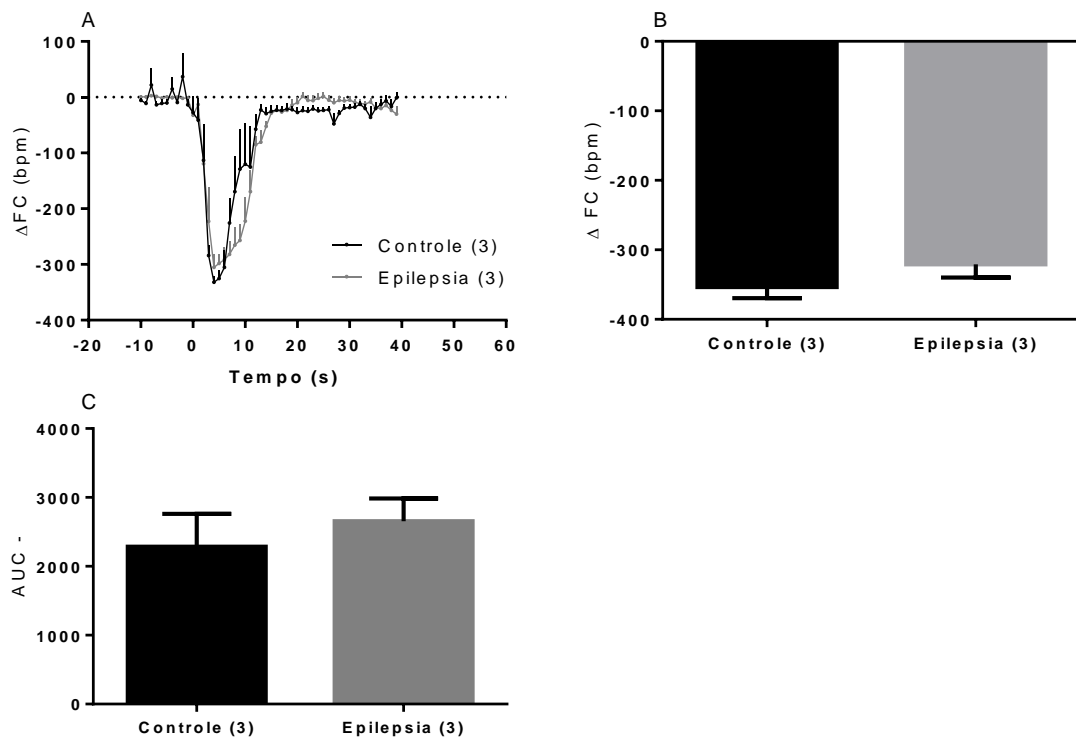


Figura 27: Variação da frequência cardíaca frente à estimulação do quimiorreflexo. Gráfico temporal da média a cada segundo (A), resposta máxima (B), área sob a curva negativa durante a resposta (C). O início da resposta é representado pela linha tracejada, tempo zero indicado como KCN. Teste T-Student.

Ambos os grupos apresentaram aumento de esforço respiratório durante a ação do KCN, o qual retornou a níveis basais. Não houve diferença estatística entre os grupos nesta resposta (Figura 28).

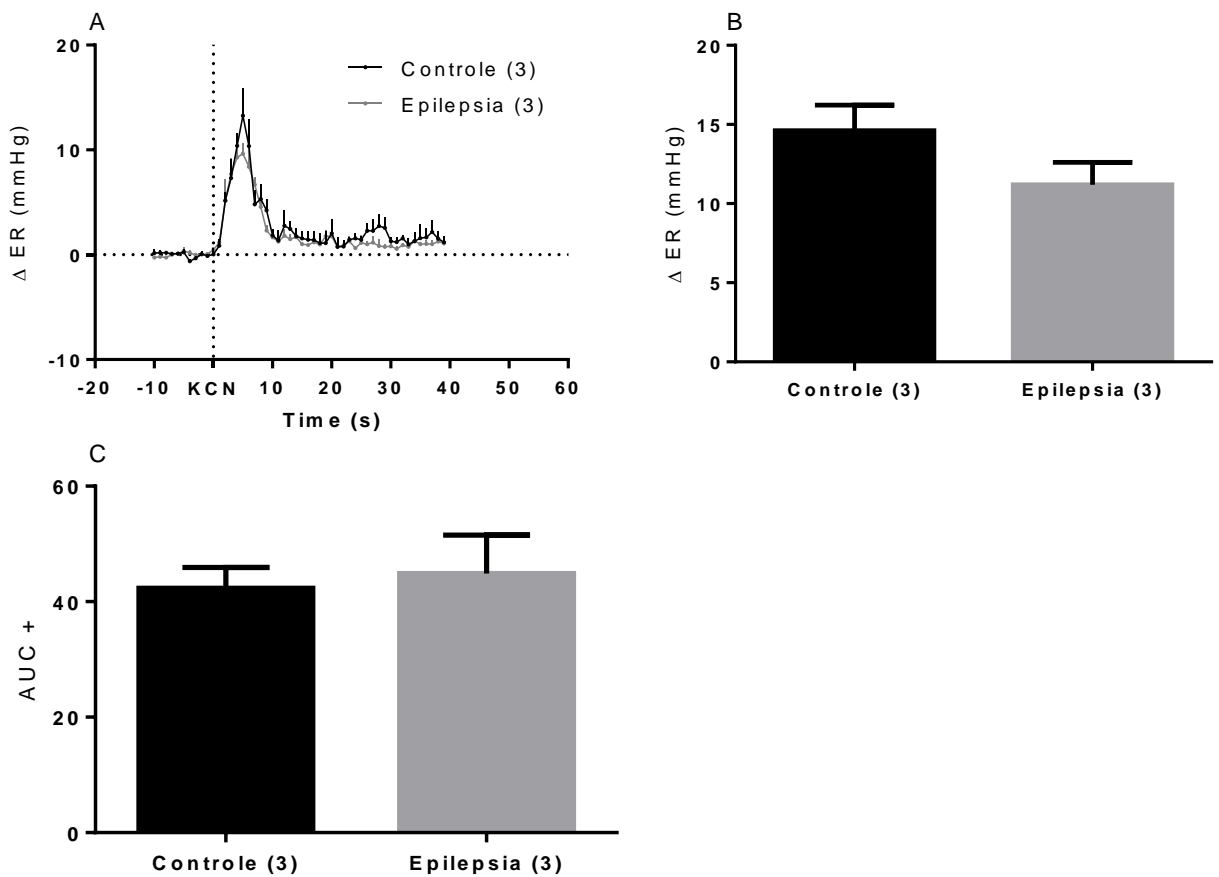


Figura 28: Variação da do esforço respiratório frente a KCN 40 $\mu$ g. Gráfico temporal (A), resposta máxima (B), área sob a curva positiva durante a resposta (C). O início da resposta é representado pela linha tracejada, tempo zero indicado como KCN. Teste T-Student.

#### 4.5. Imunoistoquímica

Podemos observar que não houve diferença entre os grupos na região RTN, tanto para a marcação com Phox2b, quanto com NK1 (Figura 29 A-D). Da mesma forma, não houve diferença entre os grupos na região do complexo Bötzing, marcada com NK1 (Figura 29 G-H). No entanto, quando avaliamos a densidade de neurônios marcados com NK1 no núcleo pré-Bötzing (Figura 29 E-F), observamos, de forma interessante, que os animais com epilepsia apresentam maior densidade quando comparados aos animais controle (Ct: 14,50 $\pm$ 2,65 vs Ep: 30,27 $\pm$ 2,89, p=0,033).

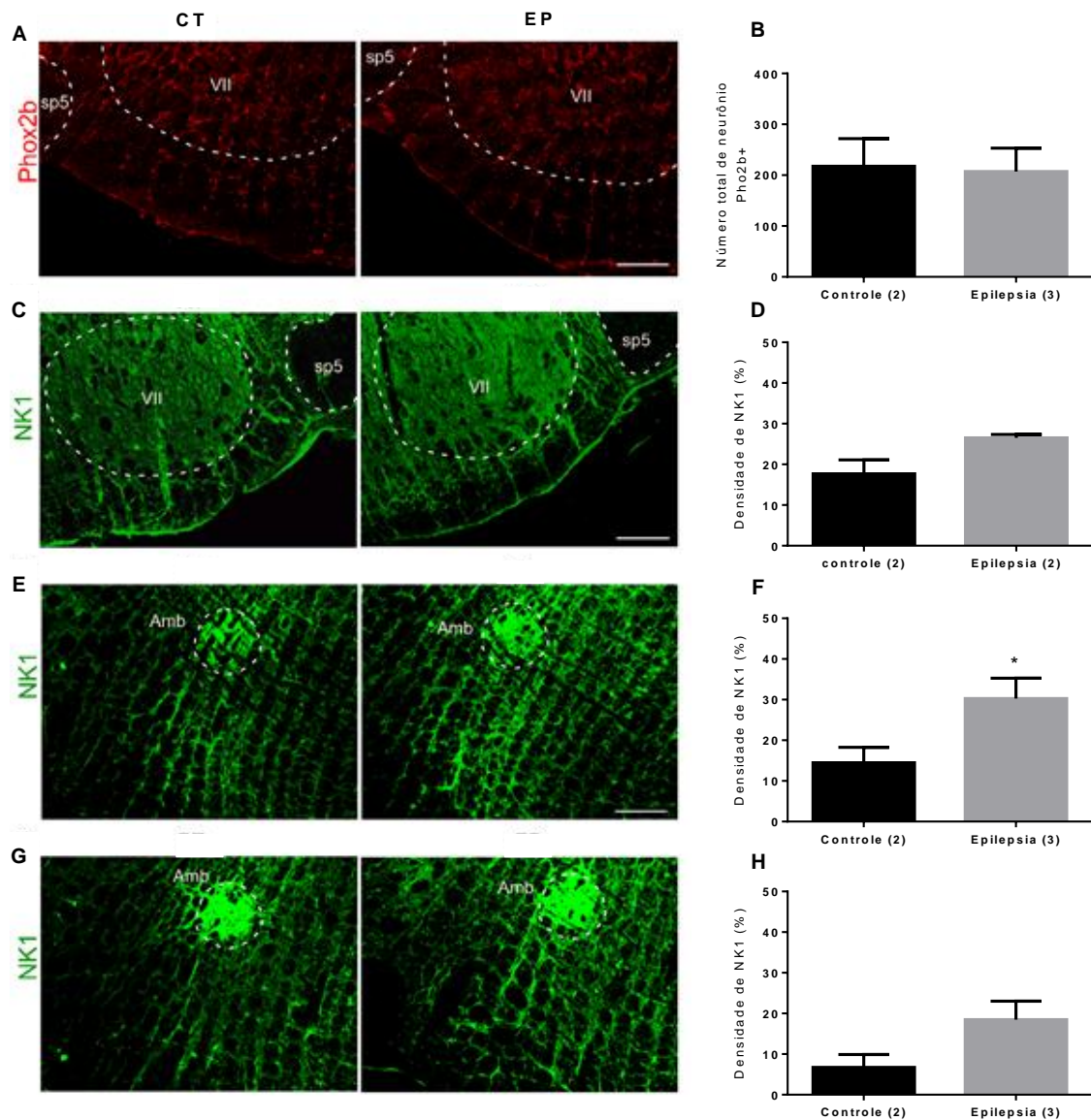


Figura 29: Contagem neuronal e/ou densidade óptica no RTN (A e B - Phox2B em vermelho; C e D: NK1 em verde), Pré-Bötzing (E e F) e Bötzing (G e H) de ratos controle (primeira coluna) e com epilepsia (segunda coluna). Teste T-Student, \* $p < 0,05$ . RTN: núcleo retrotrapezóide. Phox2B: paired like homeobox 2B. NK1: Neurocinina 1. Amb: núcleo ambíguo.

Avaliando a presença de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da Rafe pela da marcação por TrpOH, vimos que os animais com epilepsia apresentaram menor quantidade de neurônios na Rafe Magnus (Ct:  $495,0 \pm 17,0$  vs Ep:  $284,5 \pm 69,5$ ;  $p = 0,049$ ; Figura 30 A-B) e Rafe pallidus (Ct:  $160,5 \pm 4,5$  vs Ep:  $109,7 \pm 16,3$ ;  $p = 0,049$ ; Figura 30 C-D), porém sem alteração na Rafe obscurus (Ct:  $73,00 \pm 10,0$  vs Ep:  $63,33 \pm 17,32$   $p = 0,35$ ; Figura 30 E-F).

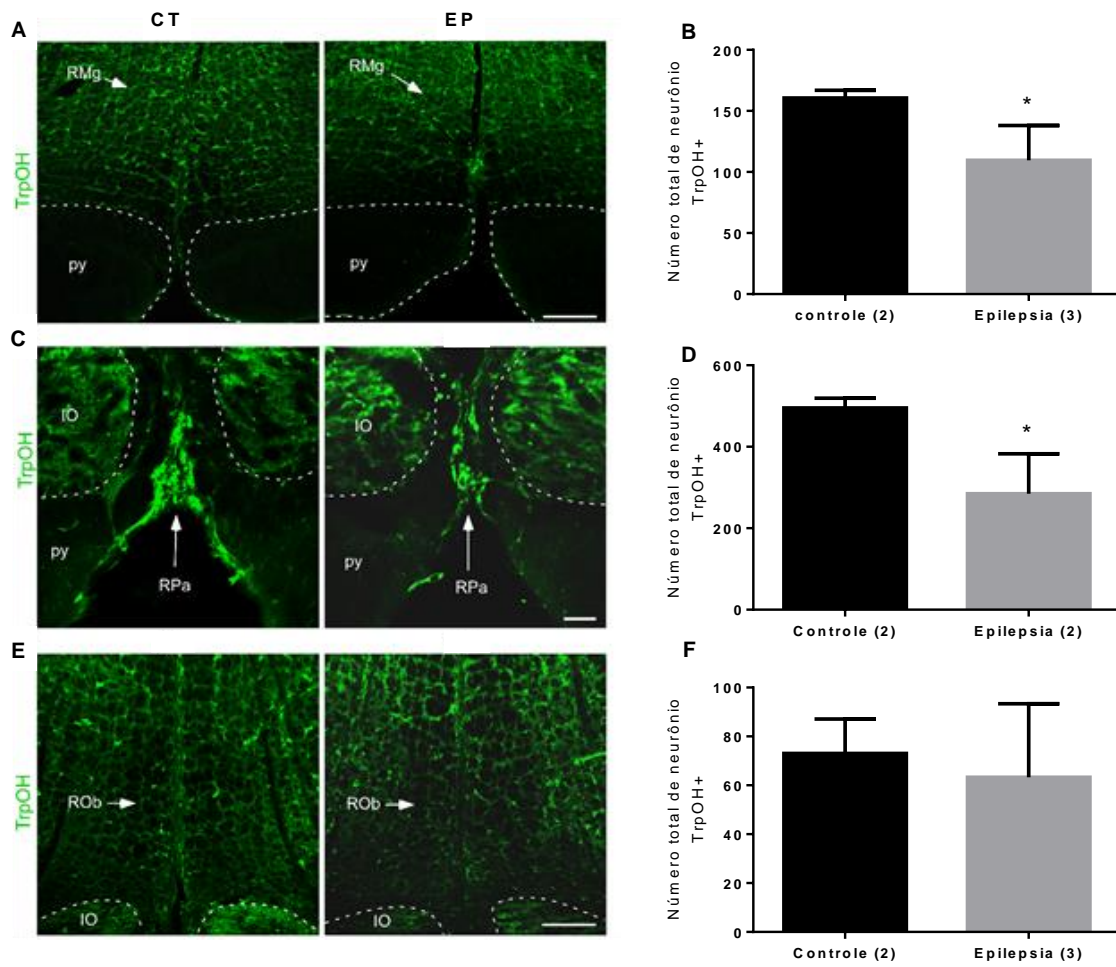


Figura 30: Contagem neuronal e/ou densidade óptica de neurônios positivos para TrpOH na RMg (A e B), RPa (C e D) e ROb (E e F) de ratos controle (primeira coluna) e com epilepsia (segunda coluna). Teste T de Student,  $*p < 0,05$ . RMg: Rafe magnus; Rob: Rafe obscurus; RPa: Rafe pallidus. Py: trato piramidal; IO: Oliva Inferior; TrpOH: triptofano hidroxilase. Teste T não pareado,  $*p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram: 1) o sono basal dos ratos com epilepsia possui menor fração de REM no ciclo de 24h, mas redução de NREM e aumento de Vigília em 12h de fase escura; 2) ratos com epilepsia apresentaram maior atividade de ondas lentas em ambas as fases do sono; 3) apneias no sono REM são mais longas que no sono NREM, porém na epilepsia não há esta diferença; 4) nos ratos com epilepsia, o protocolo de apneias em REM promoveu redução desta fase no início do período de recuperação; 5) ratos com epilepsia tenderam a apresentar menor esforço respiratório durante as apneias em vigília, mas sem diferença nas apneias durante o sono; 6) na epilepsia, o quimiorreflexo produziu uma menor resposta pressora, a qual teve padrão bifásico; 7) ratos com epilepsia apresentaram maior densidade neuronal nas regiões pré-Bötzing, e menor número neurônios na RMg e RPa.

Neste estudo foi utilizado o modelo da PILO para indução da epilepsia nos animais, o qual é um dos modelos que mimetiza de forma fidedigna a epilepsia do lobo temporal (ELT) (12,17), induzindo esclerose hipocampal importante, mimetizando a que ocorre em pessoas com epilepsia (14). A esclerose hipocampal é decorrente da perda neuronal na região do hipocampo, seguida por gliose reativa (116). No modelo da PILO, a plasticidade neuronal que ocorre após a morte neuronal durante o período de SE é responsável pela epileptogênese e início das crises espontâneas (12).

O tempo de epilepsia neste estudo foi padronizado entre 30 e 60 dias para descartar o efeito da epileptogênese e manter um tempo mínimo de período crônico, uma vez que a frequência de crises epiléticas é o principal fator de risco para a SUDEP (117).

Tem sido relatado que pacientes com epilepsia apresentam mais distúrbios do sono quando comparados a pacientes sem epilepsia. Neste cenário, nossos achados mostram que os animais com epilepsia possuem alteração do sono basal, com aumento de vigília e diminuição de sono NREM durante a fase escura do ciclo e redução do sono REM no sono total de 24h. Tal resultado corrobora parcialmente com outros estudos que mostraram não só redução da fração de vigília, mas também das fases do sono específicas NREM e REM. O estudo de Bazil et al. mostrou menor porcentagem de sono NREM e REM e maior porcentagem de vigília (52) em pacientes com epilepsia não controlada. Da mesma forma, Almeida et. al demonstraram que



pacientes com epilepsia apresentavam mais dificuldade para iniciar o sono e passavam mais tempo em vigília com redução significativa de sono REM(118).

Além de alteração nas frações do sono, verificamos diferenças na relação de ondas delta e theta do EEG nos ratos com epilepsia, sugerindo alteração na homeostase do sono. Neste sentido, verificamos aumento desta relação nas fases NREM e REM, demonstrando aumento de ondas delta no REM, em detrimento de ondas theta. Esta redução do ritmo theta pode ser decorrente da extensa perda neuronal hipocampal na condição de epilepsia, visto que o hipocampo é a principal região geradora de ondas theta, via neurotransmissão GABAérgica e colinérgica (39,119,120). Inclusive, o aumento de acetilcolina no hipocampo relaciona-se ao aumento do ritmo theta observado no sono REM, o qual está relacionado à consolidação de memórias emocionais (121,122). De fato, sabe-se que o sistema colinérgico está alterado na epilepsia do lobo temporal (123)

Em animais com epilepsia, os distúrbios do sono podem estar relacionados a alterações no SNC, decorrentes da doença. Rocha et al. mostraram que ratos com epilepsia induzida pelo modelo da PILO apresentam alterações nos receptores para melatonina MT1 e MT2 no hipocampo, os quais são importantes para indução e manutenção do sono nestes animais (124), corroborando, em parte, com nossos resultados. Neste cenário, Kim et al. demonstraram que hipocampos de animais com epilepsia possuem atividade epileptiforme, além de picos unipolares de alta amplitude e descontinuidade no sinal elétrico quando comparado aos animais sem epilepsia (125). Na mesma linha, Najafi et al., verificaram que a maioria dos pacientes com epilepsia do lobo temporal apresentavam alterações no EEG, tais como espículas e atividade epileptiforme, as quais relacionaram-se ao risco de desenvolver crise (126). Desta forma, a alteração na porcentagem de ondas delta e theta durante o sono pode ser decorrente da plasticidade sináptica nos animais com epilepsia. Outro fator que pode estar relacionado ao aumento da relação  $\delta/\theta$  é a perturbação do padrão de sono na epilepsia, uma vez que  $\delta/\theta$  é um parâmetro utilizado para quantificação da atividade de ondas lentas (127,128). Esta, por sua vez, é considerada um marcador para pressão de sono e sonolência decorrente de fragmentação ou privação (127).

O aumento das ondas lentas pode ter implicações na susceptibilidade a crises. Isto se dá por conta da maior sincronização neural, a qual facilita a deflagração e propagação das crises. De fato, as crises são facilitadas durante o sono NREM, fase de maior sincronização, ao passo que o oposto ocorre no sono REM, fase

caracterizada por dessincronização do EEG (122,129,130). Portanto, o aumento destas ondas inclusive na fase REM pode estar relacionado à maior susceptibilidade destes animais em deflagrar crises epiléticas durante o sono.

A alteração do padrão do sono e de ondas do EEG é comum em distúrbios relacionados ao sono, especialmente quando há sua fragmentação e/ou privação (122,131). Nestes casos, pode haver maior pressão de sono, aumentando a relação  $\delta/\theta$ , como comentando anteriormente. Neste cenário, pacientes com epilepsia apresentam mais distúrbios relacionados ao sono, com destaque à AOS (132). A presença da AOS causa fragmentação do sono, prejudicando sua eficiência, além de predispor à crises (133,134). Neste estudo, contudo, não verificamos a presença de AOS espontâneas, este fato pode estar relacionado à fisiopatologia da apneia.

Na AOS, a tonicidade muscular da região do sistema respiratório superior é diminuída durante o sono. Este fato, somado à posição de decúbito dorsal, facilita o colapamento das estruturas adjacentes à laringe, obstruindo a via aérea (105). Pelo fato dos ratos serem quadrúpedes, esta fisiopatologia é dificultada, o que poderia justificar a ausência de AOS espontâneas.

Por outro lado, observamos que os animais com epilepsia apresentaram maior quantidade de ACS, as quais tiveram uma tendência a acontecerem mais na fase REM(135). Durante o sono, há instabilidade respiratória, facilitando distúrbios respiratórios. Além da diminuição do tônus muscular nas vias aéreas superiores, descrito previamente, há redução do controle ventilatório e alteração nos reflexos respiratórios, predispondo a ocorrência de ACS (136).

Tendo em vista o carácter integrado da modulação respiratória (137–139), e que os animais com epilepsia apresentam disfunções no sono, associado ao fato de que possuem morte neuronal em diversas regiões encefálicas, nossa hipótese inicial foi de que estes animais apresentariam maior quantidade de eventos respiratórios basais, como suspiros e apneia central (14). Os suspiros são mais comuns durante a transição de sono NREM para REM e de sono REM para vigília e são importantes para o recrutamento alveolar e despertar (140). Contudo, não verificamos diferença entre os grupos, embora tenhamos observado uma tendência a maior número em ratos com epilepsia. Desta forma, nossa hipótese só se confirmou para a presença de ACS.

Sob o ponto de vista anatômico, verificamos que os animais com epilepsia possuem alteração nas regiões que controlam a respiração. Observamos maior

densidade neuronal no complexo pré-Bötz, o centro gerador respiratório (82,84,141) e uma redução nos neurônios serotoninérgicos da Rafe, relacionados ao controle respiratório.

O aumento da densidade de neurônios no grupamento pré-Bötz pode ser uma resposta compensatória decorrente de alteração nas vias de controle respiratório, podendo estar envolvidas no número de apneias centrais. De fato, neurônios da RPa e RObs estão ativos em resposta à  $PO_2$  e  $PCO_2$ , promovendo efeitos excitatórios sobre o pré-Bötz (94,142). Em nosso estudo, os ratos com epilepsia apresentaram redução dos neurônios da RPa, o que poderia levar à um aumento de neurônios no pré-Bötz para compensar essa aferência reduzida.

Além da RPa, a RMg também apresentou redução de neurônios na epilepsia. Estas duas regiões estão relacionadas com o controle cardiorrespiratório. No estudo de Mason et al. em 2007 feito em um modelo animal anestesiado, demonstrou-se que a RMg apresenta relação direta com a modulação respiratória e pressão arterial (143). A RPa, assim como a Rob, são regiões sensíveis a variações na  $PCO_2$ , contribuindo para as vias da quimiorrecepção central. Além disso, a RPa atua na manutenção da patência das vias aéreas, pois excita o núcleo ambíguo, o qual inerva a musculatura da laringe (144). No presente estudo, verificamos que nos ratos com epilepsia há redução de neurônios serotoninérgicos da RMg e RPa, o que poderia estar relacionado ao maior número de ACS.

De fato, a epilepsia tem sido relacionada à alteração na transmissão serotoninérgica (96). A redução da transmissão serotoninérgica está relacionada ao aumento de crises, ao passo que seu aumento reduz as crises. Em pacientes com epilepsia, estudos mostram redução na expressão de receptores serotoninérgicos e em modelos animais, a alteração serotoninérgica aumenta susceptibilidade a crises e à SUDEP (96,145–147). Desta forma, nosso resultado corrobora com a literatura.

Ao estudarmos a influência do nosso protocolo sobre a arquitetura do sono não observamos resultados significativos no que diz respeito a possível privação do sono que o protocolo poderia acarretar. Os animais não apresentaram diminuição da fase do sono em que acontecia a indução das apneias durante as 8h do protocolo. Contudo, embora não haja privação, há fragmentação do sono devido aos múltiplos despertares induzidos pelos eventos obstrutivos. De forma inesperada, verificamos que nas primeiras 8h de recuperação pós-protocolo de apneias em REM, houve redução da fase REM somente nos animais com epilepsia.

Nossa hipótese inicial era de que ao induzirmos apneia nas respectivas fases do sono, haveria, após o término das apneias, uma resposta compensatória no sentido de aumentar a fração do sono que foi perturbado. Contudo, esta hipótese foi refutada, pois somente encontramos alteração após apneias em REM e esta fase foi reduzida, não aumentada.

Uma provável explicação para este resultado é o fato de animais com epilepsia serem mais responsivos ao estresse e serem hiperativos (148), o que poderia contribuir para redução de REM. Sabe-se que animais com epilepsia apresentam maior nível de estresse com concomitante aumento de cortisol (148). De fato, o estudo de Calabrese et al., relacionou maior concentração de cortisol em paciente com epilepsia e relacionou ao aumento da probabilidade de ocorrência de SE nestes pacientes (144). De forma semelhante, estudo de Laakso et al. relacionou os níveis de cortisol e melatonina com alterações no ciclo sono-vigília (150).

Também não podemos descartar a hipótese de que a própria redução de REM no período de recuperação seja um indício de resposta compensatória à fragmentação do sono. Isso porque, como dito anteriormente (122,131), o aumento de ondas lentas (característica do NREM) reflete um aumento da pressão de sono. Neste sentido, como não verificamos alteração na fração total de sono (NREM+REM) no período pós apneia, infere-se que a redução do REM ocorreu às custas de aumento de sono NREM.

Com relação às características das apneias, verificamos que nos animais controles há uma nítida diferença da duração das apneias de acordo com a fase do sono, sendo as apneias em REM mais longas que as em NREM. Na epilepsia esta diferença não ocorre e as apneias assumem uma duração intermediária entre os tempos encontrados em NREM e REM. Ou seja, na epilepsia, as apneias em NREM são mais longas e as em REM mais curtas, ambas em relação aos animais sem epilepsia. Este resultado sugere que na epilepsia há alteração nos mecanismos relacionados ao despertar, provavelmente por dessensibilização de reflexos respiratórios, uma vez que na epilepsia houve uma tendência de os animais apresentarem menor esforço respiratório e resposta quimiorreflexa periférica alterada.

Em uma abordagem mecanicista, o despertar frente a oclusões da via aérea ocorre por ativação dos quimiorreceptores e também pelo esforço respiratório. Neste caso, a hipóxia e hipercapnia decorrentes da oclusão levariam a excitação dos quimiorreceptores, e conseqüentemente, do estímulo respiratório, provocando o

despertar(151). Adicionalmente a esta linha de raciocínio, Gleeson et al. ao investigarem os mecanismos de despertar na AOS, propuseram que o aumento do esforço respiratório é o principal estímulo para o despertar, independente da fonte de aumento da atividade respiratória (102).

Mais uma vez, nossos resultados podem ser parcialmente explicados pela redução de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da Rafe, os quais estão relacionados à quimiorrecepção e estimulação de áreas inspiratórias. Ademais, os ratos com epilepsia apresentaram uma resposta diferente frente à ativação do quimiorreflexo. Neste caso, a resposta pressórica foi menor e seguida por uma hipotensão, caracterizando uma resposta bifásica. Embora não significativo, o esforço respiratório tendeu a ser menor.

Portanto, nossa hipótese é a de que a quimiorrecepção e/ou aferência respiratória estejam prejudicadas, devido a alterações nas regiões da Rafe e pré-Bötz, o que, associado às alterações na homeostase do sono, alterariam o limiar para o despertar em cada fase do sono.

Sabe-se que o ciclo sono-vigília é regulado por vários grupos de neurônios que vão do prosencéfalo à medula (152). Vários conjuntos de neurônios são considerados promotores de vigília como neurônios dopaminérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos (147,148,149). Além disso neurônios serotoninérgicos estão envolvidos na regulação do sono e despertar, visto que Iwasaki et al. demonstraram que a ablação de neurônios serotoninérgicos no SNC na Rafe Dorsal e Mediana causou diminuição da fase REM e atenuação de respostas excitatórias que provocariam o despertar (62). Sendo assim, é possível que na epilepsia os mecanismos de sono e despertar relacionados aos neurônios serotoninérgicos estejam prejudicados, dificultando o despertar dos animais frente a estímulos como a hipercapnia, hipótese que já vem sendo relacionada ao risco à SUDEP (96,156).

Em relação às respostas cardiovasculares, verificamos que durante a apneia em vigília há bradicardia acentuada, retornando aos valores basais após o seu término, assim como verificado em outros estudos (115,157). Durante as apneias no sono NREM e REM esta resposta bradicárdica foi atenuada, porém seguida de uma taquicardia após o término da obstrução e, conseqüentemente, o despertar do animal. Esta redução da resposta é provavelmente decorrente da redução dos reflexos durante o sono e a taquicardia decorrente do despertar. Este padrão de resposta foi o mesmo para os animais com epilepsia.

## **6. CONCLUSÃO**

Pelo exposto, concluímos que a modulação respiratória na epilepsia está prejudicada e que as apneias do sono promovem mais alterações na arquitetura do sono na condição de epilepsia, a qual já apresenta disfunções de base no ciclo sono-vigília. Portanto, nossos resultados sugerem que os animais com epilepsia seriam mais susceptíveis às consequências da AOS, justificando esta como fator de risco para a SUDEP.

## REFERÊNCIAS

1. Forsgren L, Beghi E, Öun A SM. The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review. *Eur J Neurol.* 2005;12(4):245–53.
2. JW. S. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol.* 2003;16(2):165–70.
3. Rogério S, Moreira G. Epilepsia : concepção histórica , aspectos conceituais , diagnóstico e tratamento. 2004;(32):107–22.
4. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Oficial Report: Classificação Operacional dos Tipos de Crises Epilépticas pela International League Against Epilepsy: documento da posição da Comissão da ILAE de Classificação e Terminologia. ILAE. 2017. p. 1–22.
5. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. Classificação da ILAE das epilepsias: artigo da posição da Comissão de Classificação e Terminologia da International League against Epilepsy. 2017;1–25.
6. Publishing B. Comment on Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) To. 2005;46(10):1698–702.
7. Dreifuss FE, Bancaud J, Henriksen O R-DF. Proposal for Revised Clinical and electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures. *Epilepsia.* 1981;22:489–501.
8. Luciana P. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose Hipocampal. 2006;12(1):31–6.
9. Sharma ALOKKS, Eams RAYR, Ordan WIHJ, Iller MAAM, Hacker HLEONT, Nyder PAULWS. Mesial Temporal Lobe Epilepsy : Pathogenesis , Induced Rodent Models and Lesions. *Toxicol Pathol.* 2007;35:984–99.
10. Inquisi S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. *Estud avançados.* 2013;27(77):85–96.
11. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RSG AM. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods Elsevier BV.* 2008;172(2):143–57.
12. Lemos T, Cavalheiro EA. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp Brain Res.* 1995;102(3):423–8.

13. Sawaya ACHF, Abreu IN, Andrezza NL, Eberlin MN, Mazzafera P. HPLC-ESI-MS/MS of Imidazole Alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*. *Molecules*. 2008;13:1518–29.
14. WALDEMAR A. TURSKI, ESPER A. CAVALHEIRO, MICHAEL SCHWARZ L, STANISLAW J. CZUCZWAR ZKI and LT. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, eletroencephalographic and neuropatological study. *J Immunol*. 2016;196(7):2995–3005.
15. Smolders I, Khan GM, Manil J, Ebinger G, Michotte Y. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol*. 1997;801:1171–9.
16. Lehmann T, Gabriel S, Eilers A, Njunting M, Kovacs R, Schulze K, et al. Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. *Eur J Neurosci*. 2001;14:83–95.
17. FULVIO A. SCORZA, RICARDO M. ARIDA, MARIA DA GRAÇA NAFFAH-MAZZACORATTI, DÉBORA A. SCERNI LC and EAC. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc*. 2009;81(3):345–65.
18. Priel MR, Albuquerque EX. Short-Term Effects of Pilocarpine on Rat Hippocampal Neurons in Culture. *Epilepsia*. 2002;43:40–6.
19. Costa MS, Grac M. Pilocarpine-induced status epilepticus increases glutamate release in rat hippocampal synaptosomes. *Neurosci Lett*. 2004;356:41–4.
20. Upreti C, Otero R, Partida C, Skinner F, Thakker R, Pacheco LF, et al. Altered neurotransmitter release, vesicle recycling and presynaptic structure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2012;135:869–85.
21. Timo-Laria CNNSWRTL. Phases and States of Sleep in the Rat. *Physiol Behavior*. 1970;5:1057–62.
22. Louis RP, Lee J, Stephenson R. Design and validation of a computer-based sleep-scoring algorithm. *J Neurosci Methods*. 2004;133(1–2):71–80.
23. Moruzzi G, Magoun H. (1942) Brain stem reticular formation and activation of EEG. 1:455–473. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1942;(1):455–73.
24. Marin J, Cudeiro J. Nitric Oxide-Mediated Cortical Activation: A Diffuse Wake-Up System. *J Neurosci*. 2003;23(10):4299–307.
25. Arguinchona JH, Tadi. P. *Neuroanatomy, Reticular Activating System*. 4, editor. StatPearls Publishing LLC; 2019.
26. Jones BE. From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates.



- TRENDS Pharmacol Sci. 2005;26(11):578–86.
27. Aston-jones G, Rajkowschl J, Kubiakl P, Valentinol RJ, Shipley MT. Role of the locus coeruleus in emotional activation. *Prog Brain Res.* 1996;107:379–402.
  28. Laguzzi R, Petitjean F, Expdrimentale DDM. Effets de l'injection intraventricularire de 6-hydroxydopamine. II. Sur le cycle veille-sommeils du chat. *Brain Res.* 1972;48:295–310.
  29. VILLABLANCA J. Electroencephalography and clinical neurophysiology. *Electroencephalogr clicical Neurophysiol.* 1965;19:576–86.
  30. Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB. Innervation of Histaminergic Tuberomammillary Neurons by GABAergic and Galaninergic Neurons in the Ventrolateral Preoptic Nucleus of the Rat. *J Neurosci.* 1998;18(12):4705–21.
  31. Sherin, JE; Shiromani, RW; McCarly; Saper C. Activation of Ventrolateral Preoptic Neurons During Sleep. *Science (80- ).* 1996;271(January).
  32. Kostin A, Alam A, Mcginty D, Szymusiak R, Alam N. Chronic Suppression of Hypothalamic Cell Proliferation and Neurogenesis Induces Aging-Like Changes in Sleep – Wake Organization in Young Mice. *Neuroscience [Internet].* 2019;404:541–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.053>
  33. Dyken ME, Fi AKA, Lin-Dyken DC. Sleep-Related Problems in Neurologic Diseases. *Chest J.* 2012;141(2):528–44.
  34. Silvani A, Dampney RAL. Central control of cardiovascular function during sleep. *Am j physiol Hear circ physiol.* 2013;305(75):1683–92.
  35. Benarroch EE. Control of the cardiovascular and respiratory systems during sleep. *Auton Neurosci Basic Clin [Internet].* 2019;218(September 2018):54–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2019.01.007>
  36. Nauta WJH. REGULATION RATS . AN EXPERIMENTAL OF SLEEP STUDY IN INTRODUCTION. *J Neurophysiol.* 1946;(11).
  37. Guillerminault, C; Cathala, Jp; Castaigne P. EFFECTS WITH LESION 1 ON SLEEP OF A PATIENT A BRAIN-STEM. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1973;34:177–84.
  38. Carlsson, A; Lindqvist, M; Magnusson T. 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-hidroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature.* 1957;180:1200.
  39. Biasi S De, Frassoni C, Spreafico R. GABA immunoreactivity in the thalamic reticular nucleus of the rat . A light and electron microscopical study. *Brain Res.*

- 1986;399:143–7.
40. Horne J. REM sleep vs exploratory wakefulness : alternatives within adult ' sleep debt ' ? *Sleep Med Rev* [Internet]. 2019;101252. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.smr.2019.101252>
  41. Fuller PM, Saper CB, Lu J. The pontine REM switch : past and present. *J Physiol* 5843. 2007;3:735–41.
  42. Dort CJ Van, Zachs DP, Kenny JD, Zheng S, Goldblum RR. Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *PNAS*. 2015;112(2):584–9.
  43. Neurobiology THE, Sleep OF. HHS Public Access. *Psychiatr Clin North Am*. 2016;38(4):615–44.
  44. Inayat S, Nazariahangarkolae M, Singh S, Mcnaughton BL. Low acetylcholine during early sleep is important for motor memory consolidation. *Sleep Res*. 2019;1–39.
  45. Peever J, Fuller PM, Israel B, Medical D. The Biology of REM Sleep. *Curr Biol*. 2018;26(1):1–24.
  46. Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB. A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature*. 2006;441(7093):589–94.
  47. Stöllberger C, Finsterer J. Cardiorespiratory findings in sudden unexplained / unexpected death in epilepsy ( SUDEP ). *Epilepsy Res*. 2004;59:51–60.
  48. Shouse MN, Farber PR, Staba RJ. Physiological basis : how NREM sleep components can promote and REM sleep components can suppress seizure discharge propagation. *Clin Neurophysiol*. 2000;2:9–18.
  49. Díaz-Negrillo A. Influence of sleep and sleep deprivation on ictal and interictal epileptiform activity. *Epilepsy Res Treat*. 2010;2013:7.
  50. Crespel ACPB-MM. Hypoxia and the neonatal rabbit lung: Neuroendocrine cell numbers, 5-HT fluorescence intensity, and the relationship to arterial thickness. *Clin Neurophysiol*. 2000;36(2):767–73.
  51. Matos G, Tsai R, Baldo MV, de Castro I, Sameshima K, Valle AC. The sleep-wake cycle in adult rats following pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2010;17(3):324–31.
  52. Bazil CW. Epilepsy and sleep disturbance. *Epilepsy Behav*. 2003;4:39–45.
  53. Scorza FA. Sudden unexpected death in epilepsy and the song of science. *Arq Neuropsiquiatr* 2010;68(6). 2010;68(6):835–6.

54. Nashef L, So EL, Ryvlin P TT. Unifying the definitions of sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsia*. 2012;53(2):227–33.
55. Langan Y. Sudden unexpected death in epilepsy ( SUDEP ): risk factors and case control studies. *Seizure* 2000; 2000;9:179–83.
56. So EL. What is known about the mechanisms underlying SUDEP ? *Epilepsia*. 2008;49(9):93–8.
57. Bateman LM, Li C, Seyal M. Ictal hypoxemia in localization-related epilepsy : analysis of incidence , severity and risk factors. *Brain*. 2008;131(2):3239–45.
58. Ryvlin P, Nashef L, Lhatoo SD, Bateman LM, Bird J, Bleasel A, et al. Incidence and mechanisms of cardiorespiratory arrests in epilepsy monitoring units ( MORTEMUS ): a retrospective study. *Lancet Neurol*. 2013;12:966–77.
59. Langan Y, Nashef L, Sander JWAS, Hill D. Sudden unexpected death in epilepsy : a series of witnessed deaths. *Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;68:211–3.
60. Nashef L, Garner S, Sander JWAS, Fish DR, Shorvon SD. Circumstances of death in sudden death in epilepsy : interviews of bereaved relatives. *Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;64:349–52.
61. Vilella L, Lacuey N, Hampson JP, Rani MRS. Postconvulsive central apnea as a biomarker for sudden unexpected death in epilepsy ( SUDEP ). *Am Acad Neurol*. 2018;92(3):1–12.
62. Iwasaki K, Komiya H, Kakizaki M, Miyoshi C, Abe M. Ablation of Central Serotonergic Neurons Decreased REM Sleep and Attenuated Arousal Response. *Front Neurosci*. 2018;12:1–13.
63. So EL, Sam MC, Lagerlund TL. Postictal Central Apnea as a Cause of SUDEP : Evidence From Near-SUDEP Incident. 2000;41(11):1494–7.
64. BIANCHI AL, DENAVIT-SAUBLE M, CHAMPAGNAT. Central Control of Breathing in Mammals: Neuronal Circuitry, Membrane Properties, and Neurotransmitters. *Am Phys Soc*. 1995;75(1):1–45.
65. Ezure K. Synaptic Connetions between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhuthm. *Prog Neurol*. 1990;35:429–50.
66. Ezure K, Tanaka I, Saito Y. Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat. *neuroscience Res*. 2003;45:41–51.
67. Smith JC, ELLENBERGER HH, BALLANYI K, RICHTER DW, FELDMAN JL.

- Pre-Botzinger Complex : A Brainstem Region That May Generate Respiratory Rhythm in Mammals. *Science* (80- ). 1991;254:2–5.
68. Smith JC, Abdala APL, Koizumi H, Rybak IA, Paton JFR. Spatial and Functional Architecture of the Mammalian Brain Stem Respiratory Network : A Hierarchy of Three Oscillatory Mechanisms. *J Neurophysiol*. 2007;98:3370–87.
  69. Guyenet, G P. Regulation of Breathing and Autonomic Outflows by Chemoreceptors. *Comprehensive Physiol*. 2014;4:1511–62.
  70. Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, et al. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci*. 2004;7(12):1360–9.
  71. Takakura AC, Barna F, Cruz JC, Colombari E, Moreira TS. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. *Exp Physiol*. 2014;3:571–85.
  72. Marina N, Abdala AP, Trapp S, Li A, Nattie EE, Hewinson J, et al. Essential Role of Phox2b-Expressing Ventrolateral Brainstem Neurons in the Chemosensory Control of Inspiration and Expiration. *J Neurosci*. 2010;30(37):12466–73.
  73. Richerson GB. SEROTONERGIC NEURONS AS CARBON DIOXIDE SENSORS THAT MAINTAIN PH HOMEOSTASIS. *Neuroscience*. 2004;5(June).
  74. Depuy SD, Kanbar R, Coates MB, Stornetta RL, Guyenet PG. Control of Breathing by Raphe Obscurus Serotonergic Neurons in Mice. *J Neurosci*. 2011;31(6):1981–90.
  75. Martino PF, Hodges MR, Davis S, Opansky C, Pan LG, Krause K, et al. CO<sub>2</sub> / H<sub>2</sub> chemoreceptors in the cerebellar fastigial nucleus do not uniformly affect breathing of awake goats. *J Appl Physiol*. 2020;53:226:241–8.
  76. Ben-shiang D, Nakamura A, Zhang W, Yanagisawa M, Fukuda Y, Kuwaki T. Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex : evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. *J Appl Physiol*. 2019;177:2–9.
  77. Taxini CL, Takakura AC. CONTROL OF THE CENTRAL CHEMOREFLEX BY A5 NORADRENERGIC NEURONS IN RATS. *Neuroscience* [Internet]. 2011;199:177–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.09.068>
  78. Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH. Locus coeruleus

- noradrenergic neurons and CO<sub>2</sub> drive to breathing. *Eur J Physiol.* 2008;455:1119–28.
79. Bracciali AL, Bonagamba LGH, Machado BH. Respiratory Physiology & Neurobiology Glutamatergic and purinergic mechanisms on respiratory modulation in the caudal NTS of awake rats. *Respir Physiol Neurobiol* 161. 2008;161:246–52.
  80. Subramanian HH, Moi C, Balnave RJ. Identification of different types of respiratory neurones in the dorsal brainstem nucleus tractus solitarius of the rat. *Brain Res.* 2007;1(April).
  81. Bogáthy E, Papp N, Tóthfalusi L, Vas S, Bagdy G. Additive effect of 5-HT<sub>2C</sub> and CB1 receptor blockade on the regulation of sleep – wake cycle. *BMC Neurosci* [Internet]. 2019;20(14):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0495-7>
  82. Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. BREATHING: Rhythmicity, Plasticity, Chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci.* 2003;26:239–66.
  83. Li A, Nattie E. CO<sub>2</sub> dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: stimulus intensity and sensitivity in the awake rat. *Respir Physiol Neurobiol.* 2002;133:11–22.
  84. Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, West GH, Guyenet PG. Inhibitory input from slowly adapting lung stretch receptors to retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. *J Physiol.* 2007;1:285–300.
  85. Carolina A, Takakura T, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, et al. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO<sub>2</sub>-sensitive neurons in rats. *J Physiol.* 2006;2:503–23.
  86. Kumar NN, Velic A, Soliz J, Shi Y, Li K, Wang S, et al. Regulation of breathing by CO<sub>2</sub> requires. *Science (80- )*. 2004;1(6240):4–10.
  87. Huckstepp RTR, Cardoza KP, Henderson LE, Feldman XL. Role of Parafacial Nuclei in Control of Breathing in Adult Rats. *J Neurosci.* 2015;35(3):1052–67.
  88. Gourine AVVK, Marina N, Tang F, Melina F, Figueiredo SL, Teschemacher AG, Spyer KM, et al. Astrocytes Control Breathing Through pH-Dependent Release of ATP. *Science (80- )*. 2012;571(2010).
  89. Thoby-brisson M, Rallu M, Persson K, Pattyn A, Birchmeier C, Fortin G, et al. Defective Respiratory Rhythmogenesis and Loss of Central Chemosensitivity in Phox2b Mutants Targeting Retrotrapezoid Nucleus Neurons. *J Neurosci.*

- 2009;29(47):14836–46.
90. Lazari R, Moreno C, Roberto P, Teresinha M, Cardoso DO, Mirella E, et al. Síndrome de hipoventilação central congênita associada à doença de Hirschsprung: relato de caso e revisão de literatura. *Rev Paul Pediatr.* 2016;34(3):374–8.
  91. We S, Most S. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Br Commun.* 2003;33(april):618–9.
  92. Rand CM, Carroll MS. Congenital Central Hypoventilation Syndrome and a Neurocristopathy with Disordered Respiratory Control and Autonomic Regulation. *Clin Chest Med [Internet].* 2014;14:272–5231. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2014.06.010>
  93. Spengler CM, Gozal D, Shea SA. Chemoreceptive mechanisms elucidated by studies of congenital central hypoventilation syndrome. *Respir Physiol.* 2001;129:247–55.
  94. Hodges MR, Richerson GB. The role of medullary serotonin ( 5-HT ) neurons in respiratory control : contributions to eupneic ventilation , CO<sub>2</sub> chemoreception , and thermoregulation. *J Appl Physiol.* 2010;108:1425–32.
  95. Pansani AP, Colugnati DB, Scorza CA, Cavalheiro EA, Scorza FA. Expert Review of Neurotherapeutics Furthering our understanding of SUDEP : the role of animal models. *Expert Rev Neurother.* 2016;7175(April).
  96. Richerson GB, Buchanan GF. The serotonin axis: Shared mechanisms in seizures, depression and SUDEP. *Epilepsia.* 2011;52(1):28–38.
  97. Shmuelly S, Surges R, Sander JW, Thijs RD. Prone sleeping and SUDEP risk : The dynamics of body positions in nonfatal convulsive seizures. *Epilepsy Behav [Internet].* 2016;62:176–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.06.017>
  98. Malow BA, Levy K, Maturen K, Bowes R. Obstructive sleep apnea is common in. *Neurol* 55. 2000;55:1002–7.
  99. Malow BA, Fromes GA, Aldrich MS. Usefulness of polysomnography in epilepsy patients. *Neurology.* 1997;48:1389–94.
  100. Beran RG, Plunkett MJ, Holland GJ. Interface of epilepsy and sleep disorders. *Seizure.* 1999;8:97–102.
  101. Ayappa I, Rapoport DM. The upper airway in sleep: Physiology of the pharynx.

- Sleep Med Rev. 2003;7(1):9–33.
102. Gleeson K. The influence of Increasing Ventilatory Effort on Arousal from Sleep. 1990;295–300.
  103. West J. Fisiologia respiratória. 6a ed. São Paulo; 2002. 117-31 p.
  104. Meoli AL, Casey KR, Clark RW, Coleman JA, Fayle RW, Troell RJ, et al. Hypopnea in Sleep-Disordered Breathing in Adults. Sleep. 2001;4:7–8.
  105. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, Donnell CPO. Pathophysiology of Sleep Apnea. Physiol Rev. 2010;90:47–112.
  106. Butt M, Dwivedi G, Khair O, Lip GYH. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. Int J Cardiol [Internet]. 2010;139(1):7–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.05.021>
  107. Balbani APS, Formigoni GGS. Ronco e síndrome da apnéia obstrutiva do sono. Rev Assoc Med Bras. 1999;45(3):273–8.
  108. Zhang Y, Xing Y, Yuan H, Gang X, Guo W, Li Z, et al. Impaired Glucose Metabolisms of Patients with Obstructive Sleep Apnea and Type 2 Diabetes. J Diabetes Res. 2018;2018:1–9.
  109. Lombardi C, Pengo MF, Parati G. Systemic hypertension in obstructive sleep apnea. J Thorac Dis. 2018;10(S34):S4231–43.
  110. Li P, Ghadersohi S, Jafari B, Teter B, Sazgar M. Characteristics of refractory vs . medically controlled epilepsy patients with obstructive sleep apnea and their response to CPAP treatment. Seizure Eur J Epilepsy. 2012;21(9):717–21.
  111. Nobili L, Proserpio P, Rubboli G, Montano N, Didato G, Tassinari CA. Sudden unexpected death in epilepsy ( SUDEP ) and sleep. Sleep Med Rev [Internet]. 2011;15(4):237–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smr.2010.07.006>
  112. Hajek MA, Buchanan GF. Influence of vigilance state on physiological consequences of seizures and seizure-induced death in mice. Neurophysiol. 2016;115:2286–93.
  113. Foldvary-schaefer N, Stephenson L, Bingaman W. Resolution of obstructive sleep apnea with epilepsy surgery? Expanding the relationship between. Epilepsia. 2008;49(8):1457–9.
  114. Schoorlemmer G, VRossi M, Tufik S, Cravo. SL. A new method to produce obstructive sleep apnoea in conscious unrestrained rats. Exp Physiol. 2011;96(10):1010–8.

115. Schoorlemmer GHM, Rossi M V., Tufik S, Cravo SL. A new method to produce obstructive sleep apnoea in conscious unrestrained rats. *Exp Physiol.* 2011;96(10):1010–8.
116. Blümcke I, Pauli E, Clusmann H, Schramm J, Becker A, Elger C, et al. A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2007;113(3):235–44.
117. Torbjorn Tomson, Rainer Surges, Robert Delamont, §Serena Haywood DCH. SUDEP: TIME FOR PREVENTION — EVIDENCE AND CLINICAL TRANSLATION Who to target in sudden unexpected death in epilepsy prevention and how? Risk factors , biomarkers , and intervention study designs Methods to Study Risk Factors. *Epilepsia.* 2016;57(1):4–16.
118. De Almeida CÂV, Lins OG, Lins SG, Laurentino S, Valença MM. Distúrbios do sono na epilepsia do lobo temporal. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003;61(4):979–87.
119. Yoder RM, Pang KCH. Involvement of GABAergic and Cholinergic Medial Septal Neurons in Hippocampal Theta Rhythm. *Hippocampus.* 2005;15:381–92.
120. Li S, Topchiy I, Kocsis B. The Effect of Atropine Administered in the Medial Septum or Hippocampus on High- and Low-Frequency Theta Rhythms in the Hippocampus of Urethane Anesthetized Rats. *Synapse.* 2007;419(November 2006):412–9.
121. Donohue HS, Gabbott PLA, Davies HA, Cordero MI, Sandi C, Medvedev NI, et al. CHRONIC RESTRAINT STRESS INDUCES CHANGES IN SYNAPSE MORPHOLOGY IN STRATUM LACUNOSUM-MOLECULARE CA1 RAT HIPPOCAMPUS: A STEREOLOGICAL AND THREE-DIMENSIONAL ULTRASTRUCTURAL STUDY. *Neuroscience.* 2006;140:597–606.
122. Wikenheiser AM. The role of REM sleep theta activity. *Front Psychol.* 2015;6(October):1–15.
123. Friedman A, Behrens CJ, Heinemann U. Pathophysiology of Chronic Epilepsy Cholinergic Dysfunction in Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia.* 2007;48(5):126–30.
124. Rocha AKA de A, de Lima E, Amado D, de Lima E, Amaral F, Peres R, et al. Altered MT1 and MT2 melatonin receptors expression in the hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats. *Epilepsy Behav.* 2017;71:23–34.
125. Kim J-E, Cho K-O. The Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy and EEG Monitoring Using Radiotelemetry System in Mice. *J Vis Exp.* 2018;(132):1–6.



126. Mohammad Reza Najafi, Masoumeh Malekian, Mojtaba Akbari<sup>2</sup> MAN. Magnetic resonance imaging and electroencephalography findings in a sample of Iranian patients with epilepsy. *J Res Med Sci.* 2018;46(0):0–5.
127. Bobély A. From slow waves to sleep homeostasis: new perspectives. *Arch Ital Biol.* 2001;139(1–2):53–61.
128. Franken P, Dauvilliers Y, Ghyselinck NB, Chambon P, Tafti M. Retinoic Acid Signaling Affects Cortical Synchrony During Sleep. *Science* (80- ). 2005;310:111–4.
129. Kumar P, Raju TR. Seizure susceptibility decreases with enhancement of rapid eye movement sleep. *Brain Res.* 2001;922:299–304.
130. Ellenrieder V, Ferrari-marinho T, Avoli M, Frauscher B. Facilitation of epileptic activity during sleep is mediated by high amplitude slow waves. *Brain.* 2015;138:1629–41.
131. Brunner DP, Dijk D, Borbeiy AA. Repeated Partial Sleep Deprivation Progressively Changes the EEG During Sleep and Wakefulness. *Sleep.* 1993;16(2):100–13.
132. Devinsky O, Ehrenberg B, Barthlen GM, Abramson HS LD. Epilepsy and sleep apnea syndrome. *Neurology.* 1994;44:2060–2064.
133. Foldvary-Schaefer N. Sleep and Epilepsy. *Encycl Neurol Sci.* 2014;26(3):188–91.
134. Yaqub BA, Waheed G, Kabiraj MMU. Nocturnal epilepsies in adults. *Seizure.* 1997;6(2):145–9.
135. Eckert DJ, Jordan AS, Merchia P. Central Sleep Apnea: Pathophysiology and Treatment. *Chest* [Internet]. 2007;131(2):595–607. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.06.2287>
136. Murali NS, Anna Svatikova, Somers VK. CARDIOVASCULAR PHYSIOLOGY AND SLEEP. *Front Biosci.* 2003;8(27):636–52.
137. M Gugger, S B6gershausen LS. Arousal responses to added inspiratory resistance during REM and non-REM sleep in normal subjects. *Thorax.* 1993;48:125–9.
138. Wiegand L, Zwillich CW WD. Sleep and the ventilatory in normal men response to resistive loading. *J Appl Physiol.* 2019;64:1186–95.
139. Skatrud JB, Begle L. Effect of airway impedance on CO<sub>2</sub> retention and respiratory muscle activity during NREM sleep. *J Appl Physiol.* 1988;65:1676–

- 85.
140. Ramirez J. The Integrative Role of the Sigh in Psychology, Physiology, Pathology, and Neurobiology. *Prog Brain Res.* 2015;209:91–129.
  141. Ikeda K, Kawakami K, Onimaru H, Okada Y. The respiratory control mechanisms in the brainstem and spinal cord: integrative views of the neuroanatomy and neurophysiology. *J Physiol Sci.* 2017;67(1):45–62.
  142. Corcoran A, Richerson G, Harris M. Functional link between the hypocretin and serotonin systems in the neural control of breathing and central chemosensitivity. *J Neurophysiol.* 2015;(603).
  143. Mason, p; Gao, K; Genzen J. Serotonergic raphe magnus cell discharge reflects on-going autonomic and respiratory activities. *J Neurophysiol.* 2013;98(4):1919–27.
  144. Arita H, Ichikawa K, Sakamoto M. Serotonergic cells in nucleus raphe pallidus provide tonic drive to posterior cricoarytenoid motoneurons via 5-hydroxytryptamine 2 receptors in cats. *Neurosci Lett.* 1995;197:113–6.
  145. Merlet I, Ryvlin P, Costes N, Dufournel D, Isnard J, Faillenot I, et al. Statistical parametric mapping of 5-HT 1A receptor binding in temporal lobe epilepsy with hippocampal ictal onset on intracranial EEG. *Neuroimage.* 2004;22:886–96.
  146. Giovacchini G, Toczek MT, Bonwetsch R, Lang L, Fraser C, Reeves-tyer P, et al. 5-HT1A Receptors Are Reduced in Temporal Lobe Epilepsy After Partial-Volume Correction. *J Nucl Med.* 2006;46(7):1128–35.
  147. Toczek MT, Carson RE, Lang L, Ma Y, Spanaki M V. PET imaging of 5-HT 1A receptor binding in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 2003;60:736–56.
  148. Manouze H, Ghestem A, Poillerat V, Bennis M, Ba-m S, Benoliel JJ, et al. Effects of Single Cage Housing on Stress , Cognitive , and Seizure Parameters in the Rat and Mouse Pilocarpine Models of Epilepsy. *Eneuro.* 2019;6(August).
  149. Calabresse, VP; Gruemer, HD; Tripath, HL; DeLorenzo R. Serum Cortisol and Cerebrospinal Fluid b-Endorphins in Status Epilepticus Their Possible Relation to. *arch Neurol.* 1993;50:689–93.
  150. Laakso ML, Leinonen L, Hätönen T, Alila A, Heiskala H. Melatonin, cortisol and body temperature rhythms in Lennox-Gastaut patients with or without circadian rhythm sleep disorders. *J Neurol.* 1993;240:410–6.
  151. Berry RB, Asyali MA, Mcnellis MI, Khoo MCK, Cori JM, Nicholas CL, et al. Within-

- night variation in respiratory effort preceding apnea termination and EEG delta power in sleep apnea. *Am Physiol Soc.* 1998;12:1434–41.
152. Weber F, Dan Y. Review Circuit-based interrogation of sleep control. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2016;538(7623):51–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature19773>
  153. Carter ME, Yizhar O, Chikahisa S, Nguyen H, Adamantidis A, Nishino S, et al. Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci.* 2011;13(12):1526–33.
  154. Eban-rothschild A, Rothschild G, Giardino WJ, Jones JR, Sciences B, Francisco S. VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep–wake behaviors. *Nat Neurosci.* 2017;19(10):1356–66.
  155. Scammell TE, Arrigoni E, Lipton J, Israel B, Medical D. Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron.* 2018;93(4):747–65.
  156. Sowers LP, Massey CA, Gehlbach BK, Granner MA, Richerson GB, Drive H, et al. Sudden unexpected death in epilepsy: Fatal post-ictal respiratory and arousal mechanisms. *Respir physiol neurobiol.* 2015;189(2):315–23.
  157. Angheben JMM, Schoorlemmer GHM, Rossi M V, Silva TA, Cravo SL. Cardiovascular Responses Induced by Obstructive Apnea Are Enhanced in Hypertensive Rats Due to Enhanced Chemoreceptor Responsivity. *PLoS One.* 2014;9(1).

## ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização das apneias obstrutivas do sono em ratos com epilepsia", registrada com o protocolo nº 028/18, sob a responsabilidade da Prof. Dr<sup>a</sup>. Aline Priscila Pansani e Claudio Quintino de Lima Júnior que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de 11/06/2018.

- Finalidade: ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização: 30 de dezembro de 2021
- Espécie/linhagem/raça: *Rattus norvegicus*/Wistar
- Nº de animais autorizados: 113 animais
- Peso/Idade: 250g /10 semanas
- Sexo: machos
- Origem (fornecedor): Biotério Central/UFG

  
Dra. Marina Pacheco Miguel  
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG