

DIEGO BASILE COLUGNATI

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DO
CORÇÃO DE RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE INDUÇÃO DE EPILEPSIA PELA
PILOCARPINA**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências

**São Paulo
2009**

DIEGO BASILE COLUGNATI

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DO
CORÇÃO DE RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE INDUÇÃO DE EPILEPSIA PELA
PILOCARPINA**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências

Orientador: Prof. Dr. Fulvio Alexandre Scorza

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Domingues

Cravo

**São Paulo
2009**

Colugnati, Diego Basile

Análise Morfológica e Funcional do Coração de Ratos Submetidos ao Modelo de Epilepsia Induzida pela Pilocarpina. / Diego Basile Colugnati. -- São Paulo, 2009.
xvii, 74f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de pós-graduação em Neurologia/Neurociências.

Título em Inglês: Functional and Morphological Analysis of Hearts of Rats Submitted to The Pilocarpine Model of Epilepsy.

1. Epilepsia. 2. Pilocarpina. 3. Coração. 4. Morte Súbita. 5. Variabilidade da Frequência Cardíaca. 6. Crise.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA E NEUROCIRURGIA

Chefe do Departamento

Profa. Dra. Débora Amado Scerni

Coordenador do Curso de Pós Graduação

Profa. Dra. Maria da Graça Naffah-Mazzacoratti

DIEGO BASILE COLUGNATI

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DO
CORÇÃO DE RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE INDUÇÃO DE EPILEPSIA PELA
PILOCARPINA**

Presidente da Banca

Prof. Dr. Fulvio Alexandre Scorza

Banca Examinadora

Profa. Dra. Marly de Albuquerque

Prof. Dr. Ricardo Mario Arida

Prof. Dr. Gerhardus Hermanus Maria Schoorlemmer

Profa. Dra. Vera Cristina Terra

Suplentes

Profa. Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros

Prof. Dr. Antonio Carlos Guimarães de Almeida

Aprovado em: / /

Esta tese foi realizada na Disciplina de Neurologia Experimental do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da Universidade Federal de São Paulo, durante o curso de pós-graduação em Neurologia/Neurociências. Auxílio financeiro: CNPq, FAPESP e CAPES.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a todas as pessoas que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida, dos mais difíceis aos de alegria.

Em especial aos meus pais: Walter e Maria Elizabeth que sempre souberam ouvir apoiar e repreender na medida certa para moldar o caráter de seus filhos.

Aos meus irmãos Fernando e Marianne que sempre estiveram ao meu lado apoiando e servindo como exemplo de caminho a ser seguido.

A Aline minha namorada, companheira e amiga que sempre esteve ao meu lado de maneira a me fortalecer, cada vez mais, frente às barreiras impostas pela vida, com muito amor em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao longo da vida encontramos pessoas que, sem motivo algum, nos estendem a mão muito além daquilo que esperamos; pessoas que fazem questão possibilitar o seu crescimento sem medir esforços e procuram utilizar de todos os recursos para que isso aconteça. Por isso, neste momento agradeço muito ao professor Fulvio Alexandre Scorza que me orientou com extrema sabedoria sempre respeitando minhas opiniões e me fazendo acreditar que trabalhando seriamente poderemos fazer a diferença revertendo nossos dados dispostos em planilhas de computador a benefícios para a sociedade.

Ao meu co-orientador professor Sergio Luiz de Domingues Cravo que foi de fundamental importância, mantendo as portas sempre abertas, no desafio de se realizar um trabalho envolvendo duas áreas da fisiologia que embora extremamente relacionadas na maioria das vezes são tratadas como independentes.

Ao professor Esper Abrão Cavalheiro o qual sempre serviu como inspiração e admiração por tudo àquilo que ele representa para a ciência brasileira e mundial.

Ao professor Lineu Calderazzo sempre presente nas discussões dos caminhos a serem seguidos no desenvolvimento deste trabalho desde o delineamento do projeto inicial.

Ao professor Guss Schoorlemmer que foi muito importante na elaboração das técnicas utilizadas para o monitoramento dos animais.

Ao professor Ricardo Mário Arida que sempre deu apoio às discussões do trabalho.

Ao professor Benny Schmidt pelo grande auxílio no processamento e análise histológica do tecido cardíaco.

Aos amigos de laboratório Aline Priscila Pansani, Eliza, Luciana, Leandro, Filipe, André Luiz, André César, Adriano Catani, Sérgio, Romero, Laila, Bruno, Sandra Valente, Maurício, Henrique, Érika, Carla Scorza e Danuza pelo companheirismo que é de fundamental importância para a realização de qualquer trabalho.

Aos amigos de Boteco: Fernando (Barata), Gustavo (Pompom), Fábio Mícolis, Fernando (TUNG), Cristiano Sales, os quais ajudam a promover uma discussão filosófica a respeito das “coisas do mundo”.

Aos amigos de república: Paulo (bread), Marcão, Roberto, Rodrigo Teixeira, Renato (Nato), que estão sempre disponíveis para uma cervejinha nos momentos de descanso e também para discutir “coisas do mundo”.

A todos os professores do laboratório que de maneira indireta contribuíram para a minha formação: Profa. Roberta Cysneiros, Profa Maria José, Profa Débora, Profa Graça, Prof Oswaldo Keith Okamoto.

A Silvando, Edvaldo, Luizinho, Joselita e dona Hilda pela atenção dispensada sempre que precisei de ajuda.

"A educação faz um povo fácil de ser liderado, mas difícil de ser dirigido; fácil de ser governado, mas impossível de ser escravizado."

Henry Peter Brougham

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vi
AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvi
RESUMO	xvii

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Epilepsia.....	1
1.2 Epilepsia do Lobo Temporal.....	5
1.3 Modelo de Epilepsia Induzida por Pilocarpina.....	6
1.4 Morte Súbita nas Epilepsias.....	14
1.4.1 Fatores de risco para morte súbita e inesperada nas epilepsias.....	14
1.4.2 Alterações Cardiovasculares nas Epilepsias.....	15
1.4.3 Medicamentos Antiepilépticos e Função Cardiovascular.....	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Substâncias Químicas Envolvidas.....	19
3.3 Indução do Modelo de Epilepsia Induzido pela Pilocarpina.....	20
3.4 Grupos Experimentais.....	20
3.4.1 Formação dos grupos experimentais.....	21
3.5 Monitoramento de crises (confirmação do período crônico).....	22
3.6 Implante dos Eletrodos.....	22

3.7	Análise dos Traçados Eletrocardiográficos.....	23
3.8	Avaliação da Modulação Autonômica.....	24
3.9	A análise da variabilidade da frequência cardíaca	25
3.10	Obtenção dos tecidos Cardíaco e Cerebral para análise Histológica e Histoquímica.....	26
3.10.1	Análise Histológica dos Cérebros.....	26
3.10.1.2	Método de neo – Timm.....	27
3.10.2	Análise Histológica e Histoquímica do Coração.....	27
3.11	Análise dos Dados.....	28
4.	RESULTADOS.....	29
4.1	Confirmação da reorganização das fibras musgosas.....	29
4.2	Frequência Cardíaca e Traçado Eletrocardiográfico: Comparação entre os Grupos.....	30
4.2.1	Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	32
4.2.1.1	Domínio do Tempo.....	32
4.2.1.1.1	SDNN.....	32
4.2.1.1.2	RMSSD.....	33
4.2.1.2	Domínio da Frequência.....	33
4.2.1.2.1	Potência Total.....	33
4.2.1.2.2	Lf normalizado e Hf normalizado.....	34
4.2.1.2.3	Razão Lf/Hf X 100.....	35
4.3.1	Frequência Cardíaca e Traçado Eletrocardiográfico: análise e comparação no momento da crise, nos períodos próximos à crise, no período interictal.....	35
4.3.2	Variabilidade da Frequência Cardíaca nos Períodos Próximos à Crise	38
4.3.2.1	Domínio do Tempo.....	38
4.3.2.1.1	SDNN e RMSSD.....	38
4.3.2.1.2	Domínio da Frequência.....	40
4.3.2.1.2.1	Potência Total.....	40
4.3.2.1.2.2	Baixa Frequência Normalizada.....	41
4.3.2.1.2.3	Razão Lf/Hf x 100.....	42
4.4	Análise Histoquímica do Tecido Cardíaco.....	43
5.	DISCUSSÃO.....	47

5.1 Frequência Cardíaca e Traçado Eletrocardiográfico.....	48
5.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	52
5.3 Análise Histoquímica.....	54
6. CONCLUSÃO.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ABSTRACT.....	73
APÊNDICE.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tela apresentada pelo software após a escolha do módulo detecção dos picos R do traçado eletrocardiográfico.....	23
Figura 2: Exemplo da apresentação gráfica do traçado eletrocardiográfico de um rato exibida pelo software utilizado.....	24
Figura 3: A figura mostra o momento da crise epiléptica em que ocorrem as alterações mais intensas do traçado eletrocardiográfico.....	25
Figura 4: Fotomicrografia (40X) do hipocampo dorsal mostrando a marcação de neo TIMM na região do hilo do giro dentado nos grupos controle (A), agudo (B), silencioso (C) e crônico (D). Note a intensa marcação de reorganização das fibras musgosas presente apenas nos ratos do grupo crônico.....	29
Figura 5: Frequência cardíaca média dos ratos dos grupos controle, agudo, silencioso e crônico. A letra a indica que a média deste grupo difere de todas as outras enquanto b indica que a média do grupo crônico difere da média do grupo controle (one way Anova com pós teste de Tukey, $p < 0,05$).....	30
Figura 6: os gráficos A, B, C e D representam os valores individuais e as médias, para cada grupo, do intervalo PR, complexo QRS, intervalo QT e intervalo QT corrigido respectivamente. Em B as letras <u>a</u> e <u>b</u> mostram diferença estatística em relação ao grupo controle e silencioso, enquanto em C o asterisco indica diferença entre os demais grupos.....	31
Figura 7: O gráfico mostra as médias e os desvios padrão do SDNN dos ratos do grupo controle e crônico.....	32
Figura 8: O gráfico mostra as médias e os desvios padrão dos valores RMSSD dos ratos do grupo controle e dos ratos do grupo crônico.....	33
Figura 9: Médias e desvios padrão da média da potência total dos ratos dos grupos controle e crônico.....	34
Figura 10: O gráfico A mostra os valores médios e os desvios padrão normalizados a partir da potencia total de altas frequências para o grupo controle ($62,2 \pm 6 \%$) e grupo crônico ($39,0 \pm 20 \%$) e o gráfico B mostra as médias e os desvios padrão da fração de baixas frequências para o grupo controle ($37,7 \pm 6 \%$) e grupo crônico ($60,9 \pm 20 \%$). O asterisco aponta diferença estatística para $p < 0.05$	34
Figura 11: O gráfico mostra as médias e os desvios padrão da Lf/Hf X 100 dos ratos do grupo controle e do grupo crônico.(*). as médias dos dois grupos são diferentes de acordo com o teste t de Student para $p < 0,05$	35

Figura 12: Exemplo de trecho do traçado eletrocardiográfico típico encontrado no momento das crises, a área destacada mostra extrasístoles ventriculares.....	36
Figura 13: Média da frequência cardíaca a cada segundo dos ratos com epilepsia 10 minutos antes, durante e 10 minutos depois das crises epiléticas. A região destacada representa o período médio de duração da crise e a média, a cada segundo, da menor frequência cardíaca atingida durante os períodos de bradicardia ictal.....	37
Figura 14: O gráfico mostra a média e os desvios padrão da frequência cardíaca 30 minutos antes e trinta minutos depois da crise epilética. A barra vermelha representa a crise.....	38
Figura 15: Médias e desvios padrão do SDNN dos períodos pré e pós ictais (A) e médias e desvios padrão do SDNN a cada dez minutos dos períodos pré e pós ictais (B). A barra vermelha no eixo X representa a crise epilética.....	39
Figura 16: Médias e desvios padrão do RMSSD dos períodos pré e pós ictais (A) e médias e desvios padrão do RMSSD a cada dez minutos dos períodos pré e pós ictais (B). A barra vermelha no eixo X representa a crise epilética.....	40
Figura 17: médias e desvio padrão da potência total das análises realizadas em trinta minutos antes e após as crises (A) e a cada dez minutos antes e após as crises (B).....	41
Figura 18: médias e desvio padrão da baixa frequência normalizada das análises realizadas em trinta minutos antes e após as crises (A) e a cada dez minutos antes e após as crises (B).....	42
Figura 19: médias e desvio padrão da razão Lf/Hf x 100 das análises realizadas em trinta minutos antes e após as crises (A) e a cada dez minutos antes e após as crises (B).....	43
Figura 20: Fotomicrografia (40X) da análise histoquímica (eosina e hematoxilina) realizada nos ratos do grupo controle (A), agudo (B), silencioso (C) e crônico (D). Note em a presença de necrose e reação macrofágica em D (seta), esta alteração ocorreu em 100% dos casos deste grupo.....	45
Figura 21: Fotomicrografia (40X) da análise histoquímica (Tricrômico de Gomori) realizada nos ratos do grupo controle (A), agudo (B), silencioso (C) e crônico (D). Note em a presença de proliferação mitocondrial evidenciada pela coloração avermelhada em D (seta), esta alteração ocorreu em 100% dos casos deste grupo.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: mostra os valores médios \pm desvios padrão dos valores do intervalo PR, complexo QRS, intervalo QT e intervalo QT corrigido (QTc) dos ratos dos grupos controle, agudo, silencioso e crônico.....	31
Tabela 2: Médias e desvios padrão dos valores da frequência cardíaca a cada 10 minutos antes e após as crises.....	37
Tabela 3: Médias e desvios padrão dos valores de SDNN a cada 10 minutos antes e após as crises.....	39
Tabela 4: Médias e desvios padrão dos valores de RMSSD a cada 10 minutos antes e após as crises.....	39
Tabela 5: Médias e desvios padrão dos valores de Potência Total a cada 10 minutos antes e após as crises.....	41
Tabela 6: Médias e desvios padrão dos valores de Baixa Frequência Normalizada a cada 10 minutos antes e após as crises.....	42
Tabela 7: Médias e desvios padrão dos valores da razão Lf/Hf x 100 a cada 10 minutos antes e após as crises.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ach – acetilcolina

CA – corno de Amon (cornus Ammonis)

ELT – epilepsia do lobo temporal

i.p. – intra peritoneal

kg – kilograma

mg – miligrama

ml – mililitro

pH – potencial hidrogeniônico

PILO - Pilocarpina

SE – *status epilepticus*

SNC – sistema nervoso central

Hf – Alta frequência

Lf – baixa frequência

Bpm – batimentos por minuto

Lf/Hf – razão baixa frequência; alta frequência.

PR – intervalo PR

QT – intervalo QT

QT_c – intervalo QT corrigido

SUDEP – Morte Súbita e Inesperada em Epilepsia

RESUMO

A epilepsia é um dos problemas neurológicos mais comuns. Aproximadamente 3% da população geral terão epilepsia em alguma época de suas vidas. Infelizmente, indivíduos com epilepsia tem um maior risco de morte em relação à população geral e a morte súbita e inesperada em epilepsia (SUDEP) é considerada a mais importante causa de morte diretamente relacionada à epilepsia, sendo responsável por 7,5% a 17% de todas as mortes em epilepsia, apresentando uma incidência, entre adultos, de 1 :500 a 1 :1000 pacientes/ano. Têm sido relatado alguns fatores de risco relacionados à SUDEP, dentre eles estão a refratariedade, presença de crises tônico-clônicas generalizadas, politerapia com drogas antiepilépticas, idade jovem, duração da epilepsia, início precoce da epilepsia e baixas temperaturas. Além disso, os mecanismos patofisiológicos para a SUDEP ainda não desconhecidos, mas é muito provável que arritmias cardíacas devido à isquemia miocárdica exerçam um papel importante. Baseado nisto, o trabalho objetivou avaliar a função e morfologia cardíacas de ratos durante as três fases do modelo de epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina. Do ponto de vista funcional, foram analisados o eletrocardiograma e a modulação autonômica cardíaca ; para isso, estas variáveis foram verificadas na ausência da crise, antes e durante a mesma. É importante lembrar que todas as análises foram comparadas ao respectivo grupo controle pareado pela idade. Durante o período de crise, nossos resultados mostram uma alteração bastante intensa de ritmo cardíaco devido à importante influência do sistema nervoso parassimpático. Por outro lado, nos períodos livres de crise encontramos uma maior atividade simpática nos animais com epilepsia crônica em relação aos animais do grupo controle. Do ponto de vista morfológico, encontramos características histológicas específicas nos ratos com epilepsia, tais como necrose e proliferação mitocondrial. Desta forma, nossos resultados sugerem que a condição de epilepsia crônica leva a alterações de modulação autonômica e de morfologia cardíaca que podem contribuir para o aumento de risco de SUDEP.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

Desde os tempos mais remotos a epilepsia tem intrigado a humanidade. O caráter ictal, as manifestações convulsivas, a perda do controle volitivo e o desconhecimento por parte do paciente de todo o ocorrido durante o evento convulsivo suscitavam explicações “mágicas”. Inicialmente, as explicações das crises epiléticas tiveram como base a possessão do paciente por deuses ou demônios. Essa visão religiosa foi, em parte, responsável pelo estigma e preconceito que os pacientes com epilepsia sofreram e continuam sofrendo nos dias atuais. Só no século XIX, com os trabalhos de Sommer, foi possível caracterizar a relação entre crises convulsivas e lesões localizadas no Sistema Nervoso Central (SNC).

Em função de suas características fisiopatogênicas, as epilepsias acometem os indivíduos independentemente de aspectos étnicos, climáticos ou regionais. No entanto, em decorrência de sua alta incidência e prevalência, provocam grandes repercussões nos aspectos sócio-econômicos (DE BOER et al., 2008; DUNCAN et al., 2006).

Os estudos da prevalência e da incidência das epilepsias encontrados na literatura apresentam índices com grande variabilidade. Têm sido descritos valores para prevalência entre 0,9 e 57 casos / 1.000 habitantes e para a incidência entre 26 e 190 casos / 100.000 habitantes, porém essas variações são resultantes de problemas metodológicos durante as investigações. Os problemas metodológicos mais comuns são: utilização de diferentes critérios diagnósticos, de classificação e diferentes métodos de seleção de casos e definições de epilepsia (DE BOER et al., 2008; DUNCAN et al., 2006; HAUSER & KURLAND, 1975).

Apesar desses problemas, as informações obtidas nessas investigações indicam que as epilepsias continuam sendo um problema de saúde pública maior nos países em desenvolvimento. Os dados disponíveis indicam que a prevalência em países da África, América Latina e Ásia chegam a ser de 4 a 5 vezes maior que em países industrializados (DE BOER et al., 2008; DUNCAN et al., 2006, O.M.S., 1978). Essa constatação é altamente preocupante, uma vez que esses países enfrentam grandes dificuldades econômicas, tem baixo investimento em áreas sociais aliadas a um alto grau de subemprego e desemprego.

As altas taxas de incidência e prevalência das epilepsias nos países em desenvolvimento afetam a economia na medida em que aumentam os custos econômicos diretos da doença, provenientes dos gastos médicos: drogas e hospitalizações e gastos não médicos: cuidados residenciais e transporte para o hospital. Ao mesmo tempo, aumentam os custos econômicos indiretos decorrentes da perda de produção econômica por desemprego, licença médica ou morte prematura (DE BOER et al., 2008; DUNCAN et al., 2006; ROBINSON, 1993). Como exemplo, na Argentina o custo médio das drogas antiepilépticas (DAE) é 25% mais alto que nos Estados Unidos e 145% mais alto que na Europa. Por outro lado, as novas DAE são 86% mais caras que nos Estados Unidos e 55% mais caras que na Europa (KOCHEN, *comunicação pessoal* 2009; KOCHEN, 1996).

A alta incidência das epilepsias nos países do terceiro mundo é decorrente da deficiente assistência pré-natal e maternal, alto índice de prematuridade, desnutrição, traumas durante o parto, convulsões febris da infância e de infecções, particularmente as decorrentes de parasitismo (DUNCAN et al., 2006; SANDER & SHORVON, 1985; FERNANDES et. al., 1992).

O termo epilepsia se refere a um distúrbio da atividade cerebral caracterizada pela ocorrência periódica e espontânea de atividade elétrica altamente sincronizada, acompanhada de manifestações comportamentais. Dado o caráter frequentemente focal do gerador da atividade epilética, os pacientes podem apresentar uma grande variedade de sinais clínicos. Uma vez desencadeada, essa atividade elétrica pode propagar-se para outras regiões cerebrais incorporando-as à atividade epilética. Além desse aspecto, um mesmo paciente pode apresentar formas diferentes de crises epiléticas. Esse fato dificultou o estudo sistemático das epilepsias tanto do ponto de vista epidemiológico quanto clínico e experimental (DUNCAN et al., 2006; CHANG & LOWENSTEIN, 2003; McNAMARA, 1994).

As crises epiléticas são fenômenos clínicos transitórios, decorrentes da descarga excessiva e sincronizada da rede neuronal. Essas crises podem surgir espontaneamente ou serem desencadeadas por situações como: febre, distúrbio eletrolítico, intoxicação e alterações vasculares. As manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes dependem das regiões envolvidas, podendo o paciente apresentar desde um simples sinal motor focal até crises motoras generalizadas. Neste caso, o paciente perde a consciência e apresenta atividade

motora intensa acometendo toda a musculatura estriada (CHANG & LOWENSTEIN, 2003; PEDLEY et. al., 1997). Quando a crise é acompanhada de atividade motora é denominada de crise convulsiva. Essa atividade motora pode assumir formas tônicas, indicando contrações musculares mantidas, ou clônicas, sob a forma de contrações musculares intermitentes. No entanto, o paciente pode apresentar uma crise com perda da consciência sem sinais convulsivos (CHANG & LOWENSTEIN, 2003; PEDLEY et. al., 1997).

Henri Gastaut anunciou a primeira proposta para classificação das crises epiléticas em 1969. Tal classificação era baseada em critérios clínicos, eletroencefalográficos, substrato anatômico, etiologia e idade de ocorrência das crises. A introdução de técnicas novas, como a vídeo-eletroencefalografia e os registros poligráficos, exigiu, no entanto, a revisão da classificação proposta por Gastaut. Diversas reuniões internacionais foram realizadas com especialistas desde então, culminando, em 1981, com a publicação da Classificação Internacional das Crises Epiléticas (COMMISSION, 1981).

As crises epiléticas foram então classificadas em: parciais e generalizadas. As crises parciais por sua vez foram divididas em parciais simples e complexas. As crises parciais simples têm caráter focal, iniciando em um sítio cortical com preservação da consciência.

As manifestações comportamentais das crises epiléticas são ditadas pelas funções normalmente exercidas pelas regiões corticais nas quais as crises se iniciaram, isto é, uma crise com origem no córtex motor se manifesta com atividade motora clônica da parte do corpo controlada pela região cortical de origem da crise. Da mesma forma, uma crise com origem no giro pós-central provoca o surgimento de sinais somestésicos na parte do corpo correspondente à zona de recepção cortical sensorial. A crise parcial pode, no entanto, generalizar-se secundariamente quando, então, se acompanhará de perda da consciência e da presença ou não de sinais convulsivos generalizados. As crises parciais complexas por sua vez, são caracterizadas pela presença de sinais focais de origem límbica e são geralmente acompanhadas de alterações da consciência desde o início, com ou sem a presença de automatismos (COMMISSION, 1981).

Nas crises generalizadas ocorre o envolvimento das regiões corticais de ambos os hemisférios desde o início da atividade epilética, sendo acompanhadas de perda da consciência. Crise de ausência, crises mioclônica e tônico-clônica são exemplos de crises

generalizadas. Uma crise de ausência é caracterizada por uma interrupção da atividade, acompanhada de olhar para o infinito com duração de 5 a 15 segundos, seguida do retorno à atividade normal. A crise mioclônica consiste de breves abalos musculares, semelhantes a choques, os quais podem ser confinados a uma extremidade ou generalizados. Uma crise tônica consiste de contração muscular sustentada, enquanto que uma crise clônica consiste de contrações musculares alternantes dos músculos flexores e extensores. O mais freqüente é que o paciente apresente um período inicial de atividade tônica seguido por um período de atividade clônica (COMMISSION, 1981).

As crises parciais complexas são as mais freqüentemente observadas na clínica. Caracterizam-se pela presença de automatismos, principalmente orofaciais, acompanhados de embotamento da consciência, e geralmente se iniciam no lobo temporal (COMMISSION, 1981).

Como mencionado anteriormente, um mesmo paciente pode apresentar mais de um tipo de crise epiléptica. Baseado nesse aspecto, bem como em outros fatores (etiologia e idade do início das crises) e nos achados eletrográficos, foi criada uma nova classificação das síndromes epilépticas (COMMISSION, 1989).

Devido aos avanços tecnológicos na área da epileptologia e com o aperfeiçoamento dos estudos de imagens (ressonância magnética, vídeo-eletrencefalografia), o Comitê Executivo da ILAE, no ano de 2001, publicou uma nova proposta para a classificação das crises epilépticas (ENGEL JR., 2001), que passou a ser considerada como uma entidade diagnóstica.

A classificação proposta pela ILAE (2001), foi:

- **Crises isoladas ou auto-limitadas** (crises focais ou complexas)

- **Crises contínuas** (*Status epilepticus* focal ou generalizado)

- **Crises reflexas** (desencadeadas por fatores precipitantes que podem gerar crises focais ou generalizadas)

De acordo com a classificação descrita, a etiologia das síndromes epiléticas pode ser dividida em 4 grupos (COMMISSION, 1981, 1989; SANDER, 2005):

- **Epilepsia idiopática:** geralmente não está associada a características clínicas particulares e achados eletrencefalográficos (EEG) específicos, além de ser geneticamente determinada.

- **Epilepsia criptogênica:** refere-se à crises cujas causas são desconhecidas ou difíceis de serem determinadas.

- **Epilepsia sintomática:** é aquela em que é possível determinar uma lesão estrutural epileptogênica.

- **Epilepsia progressiva:** quando está associada a alguma condição neurológica evolutiva.

1.2 Epilepsia do Lobo Temporal

A forma mais comum de síndrome epilética é a epilepsia do lobo temporal (ELT), ocorrendo em cerca de 40% de todos os casos de epilepsias, apresentando como característica principal a ocorrência de crises parciais com manifestações límbicas (ANDRADE-VALENÇA, et al, 2006; HAUSER & KURLAND, 1975). Atualmente a ELT é subdividida com critérios que se baseiam na origem e semiologia das crises classificadas como mesial e neocortical (lateral) (ENGEL JR., 2001).

Dentre essas a epilepsia do lobo temporal mesial é a mais comum abrangendo cerca de 60% de todos os casos de ELT (ENGEL JR. 1992; FRENCH, et al, 1993) envolvendo, principalmente, estruturas límbicas como o córtex entorrinal, neocórtex temporal lateral, tálamo medial, lobo frontal inferior, amígdala e hipocampo (SPENCER, 2002). É caracterizada por seu perfil clínico conhecido, onde a primeira crise surge no final da infância ou no início da adolescência, além da ocorrência de crises focais simples ou complexas e crises com generalizações secundárias menos frequentes (CENDES & KOBAYASHI, 2000).

Outro aspecto importante da epilepsia do lobo temporal é a alta refratariedade ao

tratamento farmacológico, pois apenas 30% dos casos são controlados com monoterapia. Grande parte dos pacientes necessita receber mais de uma medicação antiepiléptica, e mesmo assim, a melhora ocorre em apenas 11% dos casos (COMMISSION, 1981; ELWES et. al., 1984; MATTSON et. al., 1985; PEDLEY et. al., 1997). Nestes, geralmente, o lobo temporal está acometido por lesões histologicamente demonstráveis e a sua ressecção pode eliminar completamente as crises convulsivas em 80 a 90 % dos pacientes (DODRIL et. al., 1986; PAGLIOLI-NETO, CENDES, 2000). Assim, o padrão histológico freqüentemente observado em tecidos ressecados de pacientes com epilepsia do lobo temporal é a chamada esclerose do corno de Amon, caracterizada por acentuada perda de neurônios piramidais, do hipocampo, acompanhada de gliose. Em outros casos podem ser observados outros tipos de lesões como: neoplasias ou alterações vasculares (WOLF & WIETLER, 1993; WOLF et. al., 1994).

Embora muito já se conheça sobre as epilepsias e especialmente a do lobo temporal, existem alguns aspectos ainda não elucidados, principalmente no que se refere aos mecanismos de epileptogênese. Assim, a utilização de modelos experimentais é de grande valia, uma vez que estes permitem procedimentos investigativos impossíveis de serem realizados em seres humanos.

Dentre os modelos de epilepsia crônica, o que mais se destaca é o modelo de epilepsia do lobo temporal induzido pela pilocarpina, o qual retrata com bastante fidedignidade o fenômeno a epilepsia do lobo temporal em humanos.

1.3 Modelo de Epilepsia Induzida por Pilocarpina

Durante as últimas décadas foram desenvolvidos basicamente dois tipos de modelos experimentais de epilepsias. Os chamados modelos agudos, cujas crises são únicas e não espontâneas, e os modelos crônicos, nos quais as crises epiléticas podem se repetir em intervalos mais ou menos variáveis e os registros eletrencefalográficos podem evidenciar anormalidades intercríticas espontâneas (PURPURA et. al., 1972).

Uma vez que as epilepsias humanas apresentam crises recorrentes e na maioria das vezes ocorrem de forma espontânea, os modelos crônicos se revestem de maior importância por mimetizarem a condição humana servindo, portanto, para uma maior caracterização fisiopatológica e para avaliação de drogas antiepilépticas (LEITE et. al., 1990; BLÜMCKE et.

al., 1999).

Dentre os modelos crônicos de epilepsia, o modelo da pilocarpina tem sido amplamente usado em função da facilidade técnica e, principalmente, pela semelhança fisiopatológica com a epilepsia do lobo temporal.

A acetilcolina (Ach) é um neurotransmissor amplamente distribuído no sistema nervoso de animais, tanto de vertebrados quanto de invertebrados. Nos mamíferos, a Ach está presente em sinapses centrais e em sinapses periféricas, agindo como neurotransmissor efetor do sistema autônomo parassimpático e na junção neuromuscular. Também pode ser encontrada nas junções pré-ganglionares dos sistemas simpático e parassimpático (WERNER & TAYLOR, 1987; PAGE et. al., 1999).

A acetilcolina liga-se a dois tipos de receptores: *receptores nicotínicos*, encontrados nas membranas pós-sinápticas centrais, nas junções pré-ganglionares do simpático e do parassimpático e, principalmente, nas junções neuromusculares; e os *receptores muscarínicos*, encontrados nas membranas pós-sinápticas centrais e na grande maioria dos órgãos efetores parassimpáticos (WERNER & TAYLOR, 1987; PAGE et. al., 1999).

As drogas conhecidas como colinomiméticas do tipo muscarínico são classificadas conforme seu mecanismo de ação em dois grandes grupos: as de ação direta, que agem diretamente no receptor, como a própria acetilcolina, a muscarina, a arecolina, a metacolina, o carbacol, o betanecol e a pilocarpina (PILO); e as de ação indireta, como a fisostigmina e a neostigmina que, ao inibirem a acetilcolinesterase, enzima de degradação da acetilcolina, aumentam sua concentração sináptica (WERNER & TAYLOR, 1987; PAGE et. al., 1987).

A pilocarpina é um alcalóide de origem vegetal extraído das folhas do *Pilocarpus pennatifolius* e do *Pilocarpus jaborandi*. Sua molécula é diferente da acetilcolina possuindo um grupamento metílico ligado a um nitrogênio com arranjo tridimensional semelhante ao da acetilcolina (WERNER & TAYLOR, 1987). Desde o início do século XIX, os pesquisadores suspeitavam de uma possível relação entre mecanismos colinérgicos e as epilepsias. A ação convulsivante da acetilcolina (Ach) e da fisostigmina (inibidora da acetilcolinesterase, enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina) foi demonstrada experimentalmente no eletrocorticograma na primeira metade do século XIX (SJÖSTRAND, 1937; MILLER et. al., 1968; BRENNER & MERRITT, 1942). Grossman (1963) obteve crises convulsivas

duradouras após a injeção de Ach cristalina ou carbacol na amígdala de gatos e Forster (1975) demonstrou que injeções de Ach nos ventrículos cerebrais de gatos provocavam o surgimento de crises motoras e descargas elétricas no córtex cerebral.

Análises iniciais do líquido em pacientes com epilepsia com crises freqüentes mostraram que o conteúdo de Ach estava aumentado (TOWER & NICHOLSON, 1949). Da mesma forma, Pope et. al. (1947) demonstraram que a atividade da acetilcolinesterase estava aumentada nesses pacientes. Mais recentemente, foi demonstrado um aumento da atividade da colina acetiltransferase, enzima responsável pela síntese da Ach, no córtex de pacientes com epilepsia e que foram submetidos à ressecção cirúrgica do lobo temporal (NADI et. al., 1987; KISH et. al., 1988).

A descoberta casual de que a atropina revertia alguns dos efeitos comportamentais da injeção intracerebral de ácido caínico em ratos (KLEINROK & TURSKI, 1979; 1980), levou esses pesquisadores injetarem carbacol e betanecol no ventrículo lateral de ratos, demonstrando assim, que ambos os agentes reproduziam os efeitos comportamentais produzidos pelo ácido caínico (TURSKI et. al., 1981; 1982). O fato do betanecol ser um potente agonista muscarínico, não ser hidrolizado pela acetilcolinesterase e não ter efeito sobre os receptores nicotínicos, motivou tais pesquisadores injetarem betanecol no complexo amigdalóide e no hipocampo. Dessa forma, após injeção de betanecol no hipocampo, foram observadas crises convulsivas acompanhadas de lesões cerebrais e alterações comportamentais como: acinesia, tremor, automatismos gustatórios e olfatórios, “movimentos do cachorro molhado” (*wet dog shakes*) e crises límbicas, as quais evoluíam para *status epilepticus*. Além disso, os pesquisadores também verificaram que essas crises podiam ser antagonizadas pela co-administração de escopolamina ou atropina. Em virtude de suas propriedades químicas, o betanecol não atravessa a barreira hêmato-encefálica e, portanto, apresenta o inconveniente de ter que ser injetado de forma intracerebral (TURSKI et. al., 1983d).

Um outro agonista muscarínico, a pilocarpina, diferentemente do betanecol, pode facilmente atravessar a barreira hêmato-encefálica e ser administrada por via periférica, evitando as dificuldades técnicas da injeção intracerebral. A injeção de altas doses de pilocarpina (300 a 380 mg/kg) por via intraperitoneal, produz alterações comportamentais e variações eletrográficas indicativas de atividade epiléptica duradoura tanto em ratos (TURSKI et. al., 1983; LEITE et. al., 1990) quanto em camundongos (TURSKI et. al., 1984;

CAVALHEIRO, et. al., 1996).

A análise eletrográfica das crises induzidas pela pilocarpina em ratos e camundongos demonstra que o hipocampo é ativado inicialmente, em comparação à amígdala e ao córtex (TURSKI et. al., 1983b; TURSKI et. al., 1984; CAVALHEIRO et. al., 1997).

A atividade metabólica avaliada através da taxa de consumo de glicose (técnica da 2-desoxiglicose marcada com carbono¹⁴) durante as crises epiléticas induzidas pela pilocarpina, demonstrou um aumento energético em diversas áreas do hipocampo, no giro dentado, globo pálido, pálido ventral, amígdala, substância negra, tálamo ventro-basal e médio-dorsal, septo lateral, córtex piriforme, tubérculo olfatório, córtex frontal e visual e corpo estriado (CLIFFORD et. al., 1987; SCORZA et. al., 1996).

À microscopia eletrônica, os animais que foram submetidos ao *status epilepticus* pela pilocarpina apresentam edema intenso dos dendritos e corpos celulares neuronais e dilatação dos elementos astrogliais. Os axônios remanescentes, no entanto, permanecem relativamente intactos (CLIFFORD et. al., 1987; OLNEY et. al., 1986).

O padrão citopatológico dos cérebros dos animais injetados com pilocarpina assemelha-se à reação citotóxica cerebral ao glutamato (OLNEY et. al., 1986). No entanto, isso não significa que o sistema colinérgico tenha um potencial excitotóxico. A rigor, o que se acredita é que o sistema colinérgico seja responsável pela ativação inicial de neurônios excitatórios glutamatérgicos dando início à atividade convulsiva. A liberação sináptica excessiva de glutamato mantém a célula despolarizada e produz a liberação duradoura de cálcio dos estoques intracelulares, seguida de lesão da membrana celular. Por outro lado, a liberação sináptica excessiva de acetilcolina fornece o estímulo responsável pelos disparos neuronais observados nas crises convulsivas antes dos animais entrarem em *status epilepticus*, sem lesar as membranas neuronais. Assim, a atividade do sistema colinérgico seria responsável pela manutenção inicial da crise convulsiva levando a maior liberação de glutamato que, por sua vez, provocaria lesão celular (OLNEY et. al., 1983; 1986; SAMSOM et. al., 1985; CLIFFORD et. al., 1987).

Essa hipótese justifica a observação experimental e clínica de que drogas anticolinérgicas podem ser eficazes na prevenção do desenvolvimento de crises convulsivas,

não sendo capazes de bloquear o *status epilepticus* (ALBRIGTH et. al., 1979; CORCORAN, 1986; WESTERBERG et. al., 1984; CAIN et. al., 1987; 1988). Seguindo essa linha de pensamento, Samples et. al. (1977), Davis e Hatoum (1980) e Olney et. al. (1986) demonstraram que o lítio é capaz de diminuir o limiar convulsivo à pilocarpina em ratos, aumentando, a mortalidade dos animais em cerca de 90 a 95% nas primeiras 24 horas. Por outro lado, Venogopal e Persinger (1988) demonstraram que a administração do antagonista dopaminérgico acepromazina, na primeira hora após a injeção de pilocarpina, reduzia a mortalidade dos ratos para menos de 5%. Além disso, o padrão de aumento na utilização da glicose e a citopatologia observados microscopicamente microscópico nas convulsões produzidas pela combinação lítio/pilocarpina são idênticos aos observados em ratos injetados, apenas, com altas doses de pilocarpina (CLIFFORD et. al., 1987).

Os estudos da função dos neurotransmissores durante as crises convulsivas produzidas pela pilocarpina demonstraram uma diminuição da concentração de acetilcolina no hipocampo, córtex e estriado, imediatamente antes do início das convulsões (JOPE et. al., 1987). A essa queda inicial na concentração de acetilcolina segue-se um aumento de sua concentração no córtex e hipocampo, mas não no estriado. À medida que o *status epilepticus* progride, a concentração de acetilcolina nessas duas estruturas aumenta atingindo um pico de 461% e de 304 % no córtex e hipocampo, respectivamente, após duas horas de *status epilepticus* (JOPE et. al., 1987). Avaliando a atividade da L-glutamato descarboxilase, enzima responsável pela síntese do GABA, no cérebro de ratos submetidos à injeção de pilocarpina revelou-se uma diminuição de sua atividade no tecto mesencefálico, septo, córtex temporal, hipocampo, amígdala, córtex piriforme, tálamo e, principalmente, na substância negra (TURSKI et. al., 1986b).

A observação continuada dos animais que receberam pilocarpina e evoluíram para o *status epilepticus* demonstrou que tais animais apresentavam crises espontâneas e recorrentes tardias (TURSKI et. al., 1983c; CAVALHEIRO et. al., 1991; LEITE et. al., 1990).

Dessa forma, o modelo da pilocarpina foi em seguida melhor caracterizado e o seu seguimento temporal permitiu dividi-lo em 3 fases: período agudo, no qual os animais apresentam as crises límbicas evoluindo para *status epilepticus*; período silencioso, com duração em torno de 4 a 44 dias (média de 14,8 dias e mediana de 10 dias) caracterizado pela ausência de sinais comportamentais e eletrográficos de atividade epiléptica; e período crônico,

que inicia-se com a primeira crise espontânea que ocorre durante toda a vida do animal (LEITE et. al., 1990). Essas crises espontâneas se iniciam com automatismos faciais, clonias dos membros anteriores, elevação do corpo com apoio nas patas posteriores e perda do equilíbrio seguida por crise clônica generalizada, com duração aproximada de 40 a 60 segundos (ARIDA et al., 1999; CAVALHEIRO et. al., 1991; LEITE et. al., 1990). A avaliação do perfil circadiano mostrou que as crises espontâneas tendem a ocorrer mais frequentemente durante o período diurno, com uma frequência de duas a três crises por semana (LEITE et. al., 1990; CAVALHEIRO et. al., 1991). Por outro lado, alguns animais apresentam crises agrupadas e a frequência total dessas crises não é semelhante àquelas dos animais com crises regulares (ARIDA et al., 1999). Finalmente, após uma crise convulsiva os animais apresentam-se sonolentos e desenvolvem comportamento agressivo se manipulados. Quando os animais apresentam crises com componente tônico esse comportamento é exacerbado (LEITE et. al., 1990).

Nos diversos períodos do modelo da pilocarpina são observadas alterações eletrográficas. No período agudo, imediatamente após a injeção de pilocarpina, um ritmo teta substitui a atividade de fundo hipocampal e uma atividade rápida de baixa amplitude ocorre no córtex. Surgem, em seguida, atividade rápida com alta voltagem e espículas no hipocampo. As espículas propagam-se para outras regiões, incluindo o córtex cerebral, e evoluem para crises eletrográficas. Essas crises ocorrem a cada 3 a 5 minutos levando, finalmente, ao *status epilepticus* que permanece por um período próximo de 12 horas. Em seguida, a atividade epilética diminui gradualmente nas horas seguintes (LEITE et. al., 1990). No período silencioso, 24 a 72 horas após o *status epilepticus*, o eletrocorticograma (ECoG) tende a se normalizar, desaparecendo mais lentamente a atividade espicular hipocampal (LEITE et. al., 1990).

Nas primeiras crises espontâneas observa-se atividade paroxística apenas no hipocampo, sem alterações nos registros corticais. Durante esses episódios os animais tornam-se acinéticos, apresentam piscamento dos olhos, clonia das vibrissas e movimentos de mastigação. Nas crises seguintes, ocorre propagação da atividade paroxística para as regiões corticais e os eventos ictais apresentam maior duração. As crises espontâneas são caracterizadas por trens de atividade espicular no hipocampo, seguidos da mesma atividade no córtex. A duração raramente excede 60 segundos e é substituída por uma atividade de fundo deprimida com espículas interictais frequentes. As crises surgem sem nenhum padrão indicativo das mesmas, no entanto, um ECoG de ondas lentas de sono é substituído por um

padrão de despertar antes do início da crise (LEITE et. al., 1990).

Do ponto de vista histopatológico, a análise realizada ao final do período agudo revela lesões no córtex olfatório, complexo amigdalóide, tálamo, neocórtex e substância negra. A formação hipocampal é a região mais lesada, com extensa degeneração das células piramidais nas camadas CA1 e CA3. Observa-se ainda grande perda neuronal na região polimórfica do giro denteado (hilo), (TURSKI, et al, 1983). As lesões neuronais causadas pelas crises epilépticas são resultados de uma superprodução de radicais livres (estresse oxidativo), do aumento da produção de prostaglandinas (PG) e principalmente, pela excitotoxicidade, fenômeno caracterizado pelo aumento da excitabilidade neuronal mediada pelo glutamato, provocando acúmulo intracelular de Ca^{+2} e posterior lipólise e proteólise neuronal (BELLISSIMO, et al, 2001; CAVALHEIRO, et al, 1994). Além disso, também foi descrito neste modelo a existência de brotamento supragranular das fibras musgosas do giro denteado ou *sprouting* (MELLO, et al, 1993), semelhante àquele descrito em tecido cerebral epiléptico humano (BABB et al., 1987). Esses autores acreditam que com a perda de células hilares do giro denteado, os axônios das células granulares glutamatérgicas, que antes utilizavam essas células como alvos, passam então a fazer sinapse com seus próprios dendritos proximais, criando um circuito monossináptico excitatório e reverberante, facilitando a re-entrada do estímulo excitatório e o aparecimento de crises epilépticas. Portanto, os processos patogênicos responsáveis pela ELT envolvem uma série de fenômenos, incluindo excitotoxicidade, hiperatividade glutamatérgica, aumento da concentração de íons cálcio intracelular e reorganização de circuitos neuronais, que estão provavelmente envolvidos na epileptogênese. De uma forma muito elegante, Lemos e Cavalheiro (1994) demonstraram uma correlação positiva entre duração do *status epilepticus*, perda neuronal no hipocampo e reorganização sináptica com o surgimento de crises espontâneas recorrentes. Demonstraram que era necessário um período mínimo de 30 minutos de *status epilepticus* para que houvesse o desenvolvimento de crises recorrentes. Observaram ainda que, a intensidade da reorganização sináptica guardava relação com a frequência de crises espontâneas e sugeriram que a perda neuronal no hilo do giro dentado poderia ser o fator desencadeante do processo de reorganização sináptica das fibras musgosas.

A validade de um modelo experimental é confirmada à medida que ele responde às drogas antiepilépticas de forma semelhante à observada na epilepsia humana (CAVALHEIRO & LIMA, 1984; MELDRUM, 1986). Os modelos experimentais que reproduzem os diversos

componentes da epilepsia humana são usados para o estudo dos mecanismos geradores das crises epiléticas, bem como na avaliação de drogas com potencial anticonvulsivante (PORTER & NADJ, 1987). O *status epilepticus* induzido pela pilocarpina é atenuado ou mesmo abolido se os animais são pré-tratados pela administração sistêmica de diazepam, clonazepam, fenobarbital, valproato e trimetadiona, enquanto que a difenilhidantoína e a carbamazepina são ineficazes na fase aguda (TURSKI et. al., 1987). Na fase crônica, as crises espontâneas têm sua frequência reduzida pelo uso de fenobarbital, carbamazepina, fenitoína e ácido valpróico, enquanto que a etossuximida não tem efeito terapêutico sobre a frequência das crises (LEITE & CAVALHEIRO, 1995). Em resumo, um dos objetivos mais importantes da pesquisa na área da epileptologia é descobrir os mecanismos que tornam o cérebro cronicamente epilético. O conhecimento de tais mecanismos nos tornaria capazes tanto de impedir a instauração da epilepsia como de revertê-la quando já instalada. Assim, grande parte dos esforços dos neurocientistas básicos e clínicos tem se concentrado no desenvolvimento e aplicação de estratégias visando à limitação das conseqüências do dano do S.N.C. frente a um insulto cerebral agudo.

É muito importante salientarmos nesse contexto que atualmente, os estudos sobre mortalidade nas pessoas acometidas por epilepsia também se situam na vanguarda da investigação clínica (HUGHES, 2009; FERREIRA & TOBOSA E SILVA, 2009). Infelizmente, as informações epidemiológicas são deficientes e o diagnóstico de epilepsia não aparece registrado com a frequência esperada nas declarações de óbito (FERREIRA & TOBOSA E SILVA, 2009). De toda forma, o estudo da mortalidade por epilepsia constitui excelente parâmetro para estimar indiretamente a incidência, a gravidade ou mesmo o impacto da doença na saúde pública (FERREIRA & TOBOSA E SILVA, 2009; BRUCE et al., 1990). O monitoramento de sua tendência permite avaliar o impacto de intervenções e políticas públicas voltadas para a sua redução. Além disso, é imperioso - sobretudo em termos de prevenção - conhecer quais grupos populacionais são mais vulneráveis, em que grau e por que motivos. O reconhecimento desses grupos supõe, por sua vez, a seleção de intervenções sociais e sanitárias para diminuir ou eliminar os fatores específicos de risco, sugerindo um processo de diagnóstico, ação, avaliação e adequação das estratégias de atuação dos serviços de saúde. (FERREIRA & TOBOSA E SILVA, 2009).

1.4 Morte Súbita nas Epilepsias

Como comentado anteriormente, devemos reconhecer que a estimativa da magnitude da mortalidade por epilepsia no mundo é essencial para a administração e a avaliação dos programas de controle. Dentre todas as possíveis causas relacionadas com os altos índices de mortalidade nas epilepsias (*status epilepticus*, trauma, pneumonia), o fenômeno da morte súbita e inesperada ocupa um lugar de destaque nesse cenário.

O fenômeno de morte súbita tem sido relacionado à epilepsia desde 1910 (MUNSON, 1910). No entanto, para um melhor entendimento desse fenômeno, o congresso internacional sobre epilepsia e morte súbita, ocorrido em Londres em 1996, propôs uma definição para morte súbita: o óbito deve ocorrer de maneira não traumática, sem afogamento, pode ter ou não relatos de crise, excetuando-se *status epilepticus*, e os exames realizados após a morte não podem revelar causas anatômicas ou toxicológicas para a morte (NASHEF, 1997).

Quando analisada a população como um todo, diversos estudos relatam que a incidência de morte súbita e inesperada em pacientes com epilepsia é maior em relação aos que não apresentam essa síndrome (HUGHES, 2009; TOMSON et al., 2008; SCORZA et al., 2008; WOODBURY, 1978; ZIELINSKI, 1974; RODIN, 1968). Enquanto que alguns estudos mostram uma prevalência de morte súbita em pacientes com epilepsia de 1 para 1000 (HUGHES, 2009; TOMSON et al., 2008; SCORZA et al., 2008; STÖLLBERGER & FINSTERER, 2004; TENNIS et. al., 1995; TERRENCE, WISOTSKEY, PERPER; 1975) outros indicam que tal fenômeno é mais freqüente, proporção de 1 para cada 100 indivíduos com epilepsia (HUGHES, 2009; TOMSON et al., 2008; STÖLLBERGER & FINSTERER, 2004; SCORZA et al., 2008; HIRSCH & MARTIN ,1971; FREYTARG & LINDENBERG ,1964).

1.4.1 Fatores de risco para morte súbita e inesperada nas epilepsias.

Figuram como principais fatores de risco para morte súbita e inesperada nas epilepsias: o tipo de crise, sendo a mais relacionada à crise tonico-clônica generalizada, a alta frequência de crises epilépticas, a idade dos indivíduos com epilepsia (faixa de 20 a 40 anos de idade), tempo de epilepsia não controlada e temperaturas frias (inverno) (HUGHES, 2009;

TOMSON et al., 2008; SCORZA et al., 2008; SCORZA et al., 2007; STÖLLBERGER & FINSTERER, 2004).

1.4.2 Alterações Cardiovasculares nas Epilepsias

O fenômeno de morte súbita em epilepsia ainda não está totalmente esclarecido, no entanto, uma possível explicação é que este poderia ter causa cardiogênica (SCORZA et al., 2008; COLUGNATI et al., 2005; STÖLLBERGER & FINSTERER, 2004). Sabe-se que as arritmias são acompanhadas por uma ativação neural tanto em humanos quanto em modelos experimentais (NATELSON, 1985; LATHERS & SCHRAEDER, 1982; NATELSON & CHANG, 1993). Além disso, alguns pesquisadores observaram isquemia miocárdica e arritmias em pacientes com epilepsia do lobo temporal (TOMSON et al., 2008; TOMSON et al., 2005; STÖLLBERGER & FINSTERER, 2004; DEVINKSY et al., 1986; COHEN, 1986; BLUMHARDT et al., 1986), enquanto que outros estudos relatam traçados eletrocardiográficos normais em grande número de pacientes com epilepsia (TOMSON et al., 2008; KEILSON et al., 1986). Seguindo esse raciocínio, Leestma et al. (1984) avaliaram indivíduos com epilepsia que morreram subitamente e constataram que 40 % das vítimas morreram em seus leitos, o que exclui a possibilidade de morte acidental. Os pesquisadores observaram lesão cerebral em 60 % dos casos, provavelmente em virtude das crises epilépticas. O mecanismo que poderia explicar estas mortes envolveria arritmias cardíacas mediadas por eventos autonômicos que podem ocorrer durante as crises epilépticas.

De fato, alterações cardiovasculares e cerebrais verificadas em órgãos necropsiados de indivíduos que morreram subitamente após crises epilépticas têm sido freqüentemente descritas (STÖLLBERGER & FINSTERER, 2004). Falconer e Rajs (1976) efetuaram necropsias em 9 pacientes que morreram sem causa aparente, com detalhamento macro e microscópico dos corações e cérebros destes pacientes. Foi observado edema cerebral, dilatação e hipertrofia cardíaca, fibrose miocárdica associada com atrofia ou degeneração miofibrilar, além de lesões vasculares características de condição pós-hipóxia, similares a uma cardiomiopatia isquêmica, também observada no infarto do miocárdio (DASHEIFF & DICKINSON, 1986).

Além das alterações anatômicas e funcionais relatadas acima, evidências mostram também um aumento na atividade do sistema nervoso simpático durante as crises epilépticas

(SO, 2008; SO, 2006; STÖLLBERGER & FINSTERER, 2004). Do ponto de vista experimental, Benowitz et. al. (1986) demonstraram em ovelhas adultas com epilepsia induzida pela bicuculina um aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina), o que levou a um aumento inicial nas pressões sistêmica (sistólica e diastólica) na artéria pulmonar e na frequência cardíaca. As arritmias induzidas por crises epiléticas podem contribuir para aumentar o risco de morte súbita em pacientes com epilepsia quando comparados com a população geral (EARNEST et. al., 1992) Elas têm sido registradas mais freqüentemente na epilepsia do lobo temporal do que em outros tipos de epilepsias (BLUMHARDT, SMITH, OWEN, 1986; . VAN RIJCKEVORSEL, SAUSSO, DEBARSY, 1995).

Diversos estudos na literatura tem demonstrado a presença de taquicardia ictal em pacientes com crises parciais complexas de origem no lobo temporal. Marshal et. al. (1983), descreveram 12 pacientes que foram monitorados através de video-EEG e ECG simultaneamente, observando a ocorrência de taquicardia durante as crises epiléticas. Paralelamente, Zijlmans et. al. (2002) observaram que ocorre um aumento na frequência cardíaca de pelo menos 10 batimentos por minuto um pouco antes do início das crises em 93% dos pacientes; em 23% das crises (49% dos pacientes) a taquicardia precedeu o início clínico e eletrográfico das crises. Vale a pena salientarmos também que alguns dados clínicos sugerem o envolvimento do sistema nervoso parassimpático durante as crises epiléticas, evidenciado por bradicardia sinusal (SO, 2008; KIOK et. al., 1986). Entretanto, a bradiarritmia é menos freqüente do que a taquiarritmia (HOWELL & BLUMHARDT, 1989; EPSTEIN, SPERLING, O'CONNOR, 1992; LIEDHOLM & GUDJONSSON, 1992; . DEVINKSY, PACIA, TATAMBHOTLA, 1997).

1.4.3 Medicamentos Antiepiléticos e Função Cardiovascular

Por outro lado, vários estudos têm correlacionado o uso de antiepiléticos com alterações da função cardiovascular (TOMSON et. al., 1996). A fenitoína apresenta propriedades antiarrítmicas e deprime a hiperatividade dos nervos simpáticos cardíacos (LATHERS & SCHRAEDER, 1982). Já a carbamazepina aumenta o tônus simpático do sistema nervoso autônomo (DEVINKSY, PERRINI, THEODORE, 1994). Essa mesma droga ainda é conhecida por diminuir a condução atrioventricular, podendo assim aumentar o risco

de arritmias (HERZBERG, 1978). Paralelamente, a carbamazepina e a oxcarbazepina podem causar secreção inapropriada do hormônio antidiurético, causando hiponatremia, fenômeno que pode estar associado com o quadro de morte súbita nas epilepsias (KLOSTER, BORRESEN, HOFF-OLSEN, 1998).

Os benzodiazepínicos (ex. clonazepam) têm sido associados com o aumento do risco de morte súbita em crianças principalmente com encefalopatias associadas (SANKAR & HOLMES, 2004). Esse fenômeno pode estar relacionado a quadros de disfagia, infecções recorrentes do trato respiratório (por hipersecreção brônquica), refluxo gastroesofágico e aspiração, especialmente pelo aumento da salivação, um efeito colateral importante desses medicamentos (RINTAHAKA et. al., 1999).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Pelo o que foi apresentado, este trabalho teve como objetivo geral avaliar os seguintes parâmetros cardíacos no modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina: traçado eletrocardiográfico e modulação autonômica durante e no período entre as crises epiléticas como também, avaliar a morfologia do tecido cardíaco de animais com epilepsia.

2.2 Específicos:

Verificar se o modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina pode ser considerado um bom modelo para estudar a morte súbita e inesperada nas epilepsias.

Avaliar se no modelo da pilocarpina há alterações da modulação autonômica do sistema cardiovascular;

Analisar as alterações eletrocardiográficas no período ictal, perictal (próximo às crises) e interictal (período livre de crises);

Avaliar se a epilepsia crônica pode levar a lesões estruturais do coração de animais com epilepsia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização deste trabalho utilizamos ratos machos, da raça Wistar, adultos, pesando entre 200 e 250g no início dos experimentos. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM). Os animais foram alojados em grupos de cinco ratos, em gaiolas apropriadas, onde tiveram livre acesso à comida e água. As condições deste biotério obedecem a um ciclo claro-escuro de 12 horas (claro: 7:00h - 19:00h), sendo a temperatura ambiente mantida constante entre $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2 Substâncias Químicas Envolvidas

As drogas utilizadas neste trabalho serão discriminadas a seguir, de acordo com a procedência. Para obtenção do modelo experimental de epilepsia utilizamos o cloridrato de pilocarpina (Merck S.A. Indústrias Químicas) e a metil escopolamina (Sigma Chemica Co.). O cloridrato de pilocarpina foi dissolvido em uma concentração de 40mg/ml enquanto que a metil-escopolamina em uma concentração de 0,4mg/ml. Para o bloqueio das crises utilizamos Diazepam (União Química Ltda.) numa dose de 10mg/Kg. Como anestésicos utilizamos quetamina (Syntec do Brasil Ltda.) e xilazina (Sespo Indústria e Comércio Ltda) e pentobarbital sódico numa concentração de 75 mg/Kg. Para as análises histológicas utilizamos, hematoxilina (Harren Co.), eosina (Sigma Chemica Co.), cromotopo RR (Sigma Chemica Co.), fast green FCF (Sigma Chemica Co.), ácido fosfotúngstico (Sigma Chemica Co.), oil red O (Sigma Chemica Co.), ácido periódico (Sigma Chemica Co.), barbiturato de sódio (Sigma Chemica Co.), adenosina-5-trifosfato (Sigma Chemica Co.) coreto de cálcio (Sigma Chemica Co.), cloreto de colbato (Sigma Chemica Co.), acetato de sódio (Sigma Chemica Co.), sulfíto de amônio (Sigma Chemica Co.), ácido clorídrico (Merck S.A. Indústrias Químicas), tris base (Sigma Chemica Co.), NBT (Sigma Chemica Co.), NADH (Sigma Chemica Co.), succinato de sódio (Sigma Chemica Co.), fosfato de sódio (Sigma Chemica Co.), fosfato de potássio (Sigma Chemica Co.), formaldeído (Merck S.A. Indústrias Químicas), xileno (Fisher Co.), álcool absoluto (Merck S.A. Indústrias Químicas), etanol (Merck S.A. Indústrias Químicas), acetona(Merck S.A. Indústrias Químicas), glicerol(Merck

S.A. Indústrias Químicas), Permout (Fisher Scientific), ácido acético (Merck S.A. Indústrias Químicas), xilol (Merck S.A. Indústrias Químicas), entellan (Merck S.A. Indústrias Químicas), fucsina básica (Merck S.A. Indústrias Químicas), metabissulfito de de sódio (Merck S.A. Indústrias Químicas).

3.3 Indução do Modelo de Epilepsia Induzido pela Pilocarpina

Para obtenção de animais com epilepsia foi utilizado o modelo da pilocarpina. No desenvolvimento deste trabalho sempre utilizamos a dose de 350 mg/kg para todos os animais. Esta droga foi injetada intraperitonealmente e os seus efeitos foram observados e classificados segundo a metodologia descrita por Turski et al. (1983), que foi descrita na Introdução deste estudo.

Todos os animais injetados com pilocarpina, foram pré-tratados sub-cutaneamente com metil-escopolamina (1 mg/kg) 30 minutos antes de injeção da pilocarpina. A administração da metil-escopolamina tem por finalidade atenuar os efeitos periféricos provocados pela injeção de pilocarpina. O *status epilepticus* foi bloqueado após de três horas por administração intraperitonel de diazepam (10mg/Kg).

3.4 Grupos Experimentais

Os grupos foram divididos da seguinte forma:

- 1) **Grupo controle:** os animais receberam apenas injeções de solução salina 0,9% tanto subcutaneamente quanto intraperitonealmente, simulando o modelo de indução de epilepsia pela pilocarpina (n=6);
- 2) **Grupo Agudo:** animais submetidos somente à fase aguda do modelo da pilocarpina (n=6);
- 3) **Grupo Silencioso:** animais submetidos à fase silenciosa do modelo da pilocarpina (n=6);
- 4) **Grupo Crônico:** animais pertencentes à fase crônica do modelo da pilocarpina (n=6).

Os grupos, agudo e silencioso, foram criados para a avaliação da influência da indução do modelo da pilocarpina *per se* sobre o tecido e função do coração. Desta forma, será possível atribuir prováveis alterações cardíacas e de modulação à epilepsia propriamente dita,

pois estaremos monitorando todas as fases do modelo. A utilização desses dois grupos também foi importante, uma vez que nos possibilitou avaliar se durante os processos que levam à instalação completa da epilepsia há modificações do controle autonômico e do tecido cardíaco.

3.4.1 Formação dos grupos experimentais

Os parâmetros escolhidos para análise neste trabalho poderiam sofrer mudanças de acordo com a idade do animal. Pensando nisso, os registros eletrocardiográficos e investigações histológicas e hhhistoquímicas foram realizadas, nos grupos, de acordo com a idade média dos ratos do grupo crônico (sessenta dias após a primeira crise espontânea recorrente), o que variou entre 130 e 150 dias de vida. Além disso, em todos os grupos o implante dos eletrodos ocorreu três dias antes do início dos registros. Portanto, o protocolo experimental respeitou a seguinte seqüência:

Os ratos (n = 24) aos sessenta dias de idade foram divididos de maneira aleatória em quatro grupos distintos:

Grupo Crônico (n=06): aqueles selecionados para fazer parte do grupo crônico foram imediatamente submetidos ao modelo de indução de epilepsia pela pilocarpina. Assim que o *status epilepticus* (três horas de duração) foi bloqueado os mesmos foram levados para a sala de monitoramento por vídeo (24 horas diárias) até a detecção da primeira crise espontânea e recorrente. Após isto, para cada rato, um período de sessenta dias foi aguardado até o início das análises de VÍDEO-ECG. O monitoramento por VIDEO-ECG ocorreu durante cinco dias ou até que, pelo menos, uma crise epiléptica tenha sido registrada. Ao final do monitoramento os animais foram anestesiados com thionembital (50 mg/Kg, i.p.) e sacrificados por perfusão através da artéria aorta dando início ao protocolo de análises histológicas, imunohhhistoquímicas e hhhistoquímicas tanto do cérebro quanto do coração.

Grupo Agudo (n=06): os ratos do grupo agudo, ao atingirem a idade ideal foram submetidos ao modelo da pilocarpina sendo monitorados por eletrocardiograma até o momento das análises histológicas, imunohhhistoquímicas e hhhistoquímicas, o que ocorreu 24 horas após o bloqueio do *status epilepticus* (três horas de duração).

Grupo Silencioso (n=06): os animais do grupo silencioso respeitaram o mesmo protocolo do grupo agudo exceto pelo fato de que estes foram monitorados (VIDEO-ECG) por um tempo de sete dias após o bloqueio do *status epilepticus* (três horas de duração). Ao final deste período, os animais foram igualmente anestesiados com thionembital (50 mg/Kg, i.p.) e sacrificados por perfusão através da artéria aorta e os tecidos cerebrais e cardíacos acondicionados para as análises histológicas, imunohistoquímicas e histoquímicas. Vale ressaltar que os animais que apresentaram alguma crise espontânea e recorrente no período de sete dias foram excluídos do trabalho.

Grupo Controle (n=06): os animais do grupo controle foram monitorados concomitantemente aos ratos do grupo silencioso e após um período de sete dias foram anestesiados com thionembital (50 mg/Kg, i.p.) e sacrificados por perfusão através da artéria aorta e seus tecidos cerebral e cardíaco acondicionados para análises histológicas, imunohistoquímicas e histoquímicas.

3.5 Monitoramento de crises (confirmação do período crônico)

Todos os animais pertencentes ao grupo silencioso e crônico, imediatamente após o bloqueio *status epilepticus*, foram levados para uma sala de monitoração por vídeo na qual foram filmados 24 horas por dia.

3.6 Implante dos Eletrodos

Os animais foram anestesiados profundamente com xilazina (4 mg/Kg) e ketamina (10 mg/Kg) para o implante de eletrodos de aço inoxidável. Para isso, uma incisão de aproximadamente 20 mm foi feita na região cervical dorsal para a fixação de um conector de duas saídas. Neste conector estavam soldados dois fios de aço inoxidável devidamente isolados, exceto as pontas, que serviram como eletrodos de captação do sinal elétrico do miocárdio. Estes fios eram conduzidos subcutaneamente através de um guia até a região abaixo do diafragma, onde havia uma incisão transversal na pele de aproximadamente 10 mm e o outro para a região cervical ventral, onde também havia uma incisão na pele de mesmo tamanho. Feito isto, o eletrodo da região infra-diafragmática foi fixado por um ponto de sutura na musculatura da região peritoneal e o eletrodo do pescoço foi guiado por uma via paralela à traquéia até que penetrasse aproximadamente 20 mm na caixa torácica

(cuidadosamente para que nenhuma estrutura fosse danificada). A implantação intratorácica é importante para que se evitem os ruídos advindos da contração muscular.

3.7 Análise dos Traçados Eletrocardiográficos.

Os parâmetros eletrocardiográficos: frequência cardíaca, ritmo, duração de ondas (P, QRS, T), segmento ST e intervalo QT foram analisados tanto nos períodos interictais quanto ictais e próximos as crises (trinta minutos antes e depois) no grupo crônico. Tais parâmetros, quando possível, foram comparados aos dos animais dos demais grupos.

Os eletrodos implantados no rato foram conectados por um sistema de fios (protegidos por uma mola, a qual dava total mobilidade ao animal) a uma conexão que mantinha o contato eletrônico independente da movimentação do animal, que estava preso por um sistema de alavancas responsável por equilibrar todo o conjunto de eletrodos e mola, que tinha como finalidade exercer o mínimo de pressão e ou tração à pele do animal. Todo o conjunto estava conectado ao amplificador de sinais biológicos da *Grass Technologies*, que por sua vez, transmitia os sinais até uma placa conversora analógico-digital com 8 canais e frequência de aquisição de 1.000 Hz por canal (Power Lab/ 8SP; Adinstruments). Através do *software* de leitura da placa, Chart 5 for Windows (Power Lab System), a frequência cardíaca foi coletada continuamente com uma frequência de amostragem de 1000 Hz e um filtro passa banda de 0.5 Hz a 100 Hz.

O próprio *software* utilizado possui um algoritmo predeterminado para detecção dos picos R do eletrocardiograma, o qual pode ser ajustado de acordo com o tipo (humano, coelho e ratos) e também com a qualidade do sinal (Figura 1).

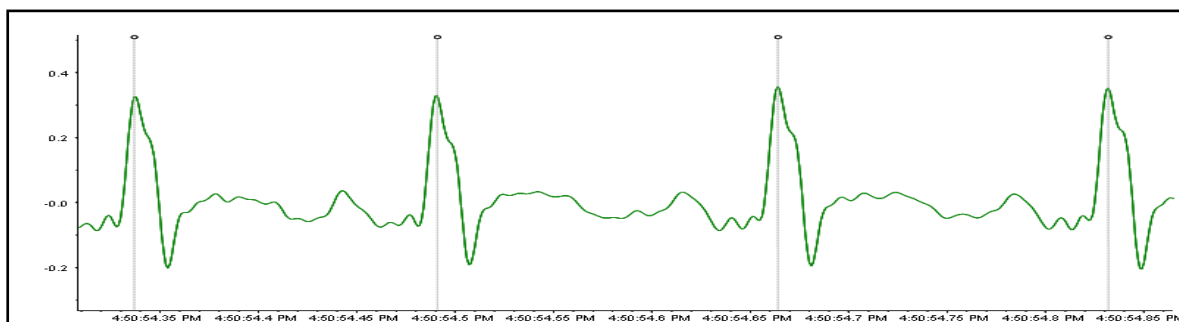


Figura 1- Tela apresentada pelo *software* após a escolha do módulo detecção dos picos R do traçado eletrocardiográfico.

O sinal eletrocardiográfico, a frequência cardíaca e os intervalos RR eram apresentados simultaneamente em canais diferentes (Figura 2). Os dados coletados eram armazenados para posteriores análises.

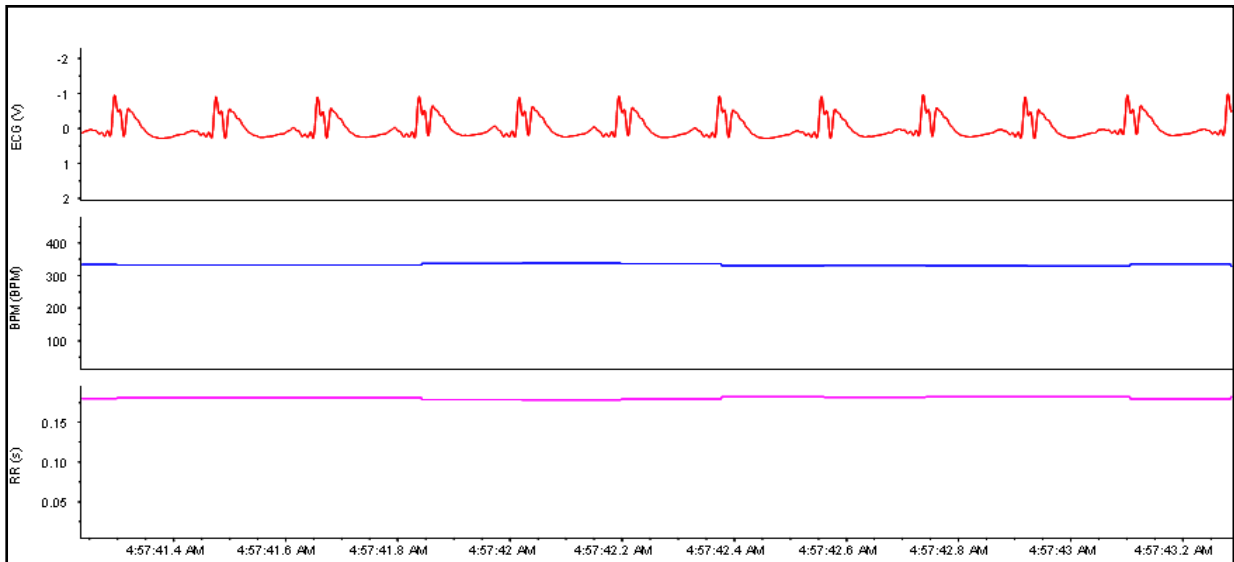


Figura 2 – Exemplo da apresentação gráfica do traçado eletrocardiográfico de um rato exibida pelo *software* utilizado.

3.8 Avaliação da Modulação Autonômica

Os dados gerados pelo software de aquisição foram armazenados e processados de forma a serem utilizados por uma rotina para Matlab[®] (The Math Works, USA) desenvolvida no laboratório de biomecânica aplicada ao movimento humano da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Presidente Prudente, pelo Professor Fábio Micolis de Azevedo.

Para a utilização desta rotina, somente sinais com períodos apresentando grande estabilidade e baixos níveis de artefatos foram selecionados. Tais períodos não podiam ter menos de 256 intervalos RR.

Mesmo após tais cuidados, a rotina possui um algoritmo de correção de intervalos RR que funciona da seguinte maneira:

- I) do sinal completo é subtraída a média de todos os intervalos RR;
- II) após uma amostra de 50 intervalos RR é selecionada e mais uma vez é obtida a média;

- III) cada conjunto de cinquenta intervalos é tratado de forma independente de tal forma que seja localizado um valor de intervalo duas vezes maior que a média obtida para a dada amostra;
- IV) Uma vez localizado, o intervalo é corrigido pela média dos dois intervalos anteriores e posteriores. Os sinais em que houve correção de mais de 10% dos intervalos foram excluídos.

A modulação autonômica do coração foi avaliada através da medida da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo: desvio padrão de todos os intervalos RR normais (SDNN) e raiz quadrada da média das diferenças dos intervalos normais (RMSSD) e também no domínio da frequência (potência total (TP), baixa frequência (Lf), alta frequência (Hf) e razão baixa frequência/alta frequência (Lf/Hf)). Os valores das bandas de frequência utilizados foram: Lf (0,2 a 0,75 Hz), Hf (0,75 a 3 Hz). Para a análise espectral foi utilizada a Transformada Rápida de Fourier (FFT) com 256 pontos.

3.9 A análise da variabilidade da frequência cardíaca

Através do monitoramento de Vídeo-ECG era possível detectar o momento em que ocorriam as crises (Figura 3).

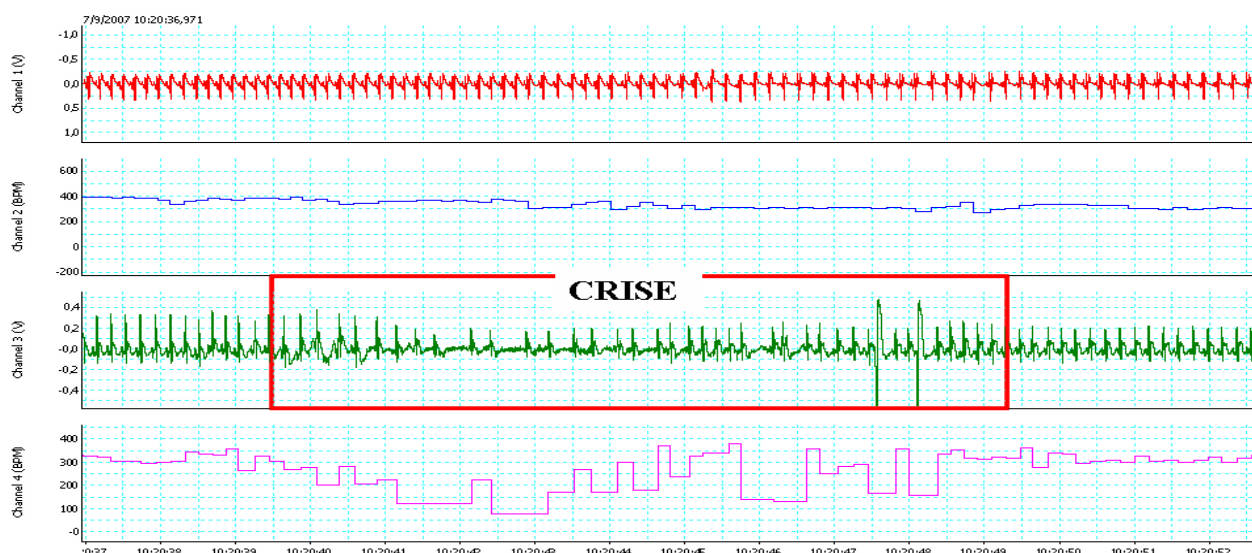


Figura 3 – A figura mostra o momento da crise epiléptica em que ocorrem as alterações mais intensas do traçado eletrocardiográfico.

Foram estabelecidos períodos de trinta minutos anteriores e trinta minutos posteriores para a análise, com o intuito de avaliarmos a modulação autonômica antes e após as crises

epilépticas. Cada período de trinta minutos ainda foi subdividido a cada dez minutos, permitindo analisar o comportamento da modulação autonômica na medida em que se aproxima e se afasta das crises.

Para a comparação com o grupo controle, um intervalo de cinco minutos (os animais estivessem com comportamento tranqüilo) e com poucos artefatos foram selecionados. Sempre tivemos precauções para que os sinais selecionados dos grupos controle e crônico respeitassem o mesmo horário do dia.

Tanto no grupo agudo quanto silencioso não foi realizada a análise da variabilidade da frequência cardíaca, pois os animais destes grupos apresentavam alterações claras que interferem na modulação autonômica (ex. a desidratação). Além disso, os animais do grupo agudo estavam sob influência de drogas que também alteram a modulação autonômica.

3.10 Obtenção dos tecidos Cardíaco e Cerebral para análise Histológica e Hhismoquímica

3.10.1 Análise Histológica dos Cérebros

Cumpridas as fases de monitoramento de crises e medição da variabilidade da frequência cardíaca, os animais foram perfundidos e os cérebros retirados para posterior análise histológica através dos métodos de neo-Timm, para confirmação da reorganização das fibras musgosas decorrentes do insulto inicial causado pelo *status epilepticus*. Assim, os animais foram anestesiados com thionembital (50 mg/Kg, i.p.) e sacrificados por perfusão através da artéria aorta. Foi feita uma abertura na caixa torácica do animal para ser possível a exposição do coração e suas artérias e veias. A artéria aorta foi puncionada com uma agulha e as soluções infundidas. A drenagem das soluções ocorreu de maneira natural, pois os corações foram retirados assim que a artéria aorta foi puncionada.

Na primeira fase da perfusão os animais receberam solução de sulfeto de sódio 0.1%, seguida por solução fixadora de glutaraldeído 3%. Todas as soluções foram preparadas em solução tamponada (pH = 7.4). A infusão foi feita com o auxílio de uma bomba de perfusão. Em seguida, os cérebros foram retirados da caixa craniana com o auxílio de uma goiva, e colocados em solução de sulfeto de sódio 0.1%, por 6 horas. Decorrido este período, foram

colocados em solução crioprotetora de sacarose 30%. Os cérebros foram, então, cortados de forma seriada em secções de 20 e 40 µm de espessura em criostato. Estes cortes foram submetidos a estudo histológico pela técnica de neo-Timm.

3.10.1.2 Método de neo - Timm

Esta é uma modificação do tradicional método de Timm, que intensifica a coloração específica de zinco, produzindo melhor visualização das fibras musgosas, permitindo fácil observação da reorganização sináptica.

Depois que os cortes de 40 µm de espessura foram montados em lâminas gelatinizadas, ocorreu a revelação em câmara escura, onde foram imersos em uma solução reveladora à 26°C. Esta solução consiste em 240ml de goma arábica; 9,4g de citrato de sódio; 10,2g de ácido cítrico mono hidratado; 6,8g de hidroquinona e 425mg de nitrato de prata, dissolvidos em 165ml de água destilada.

Os cortes assim corados foram classificados de acordo com a escala subjetiva, que aplica escala de 0-V para o brotamento de fibras musgosas supragranulares:

GRAU 0 - ausência de grânulos na região supragranular;

GRAU I – grânulos ocasionais e esparsos na região supragranular de distribuição;

GRAU II – Numerosos grânulos, distribuídos descontinuamente na região supragranular;

GRAU III – Grânulos de distribuição quase contínua na região supragranular;

GRAU IV - Densa faixa de grânulos dispostos continuamente na região supragranular ou quase contínuos;

GRAU V - Densa banda de grânulos, laminar e contínua que rodeia toda região supragranular.

3.10.2 Análise Histológica e Hhhistoquímica do Coração.

Assim que o coração foi retirado da caixa torácica, dois cortes transversais e afastados aproximadamente 5 mm um do outro foram realizados na região septal para obtenção de

fragmentos cilíndricos como amostras do miocárdio. Os fragmentos de aproximadamente 1,0 cm de altura por 0.3 cm de largura foram colocados em pé, em uma lamina de cortiça de aproximadamente 1 cm de diâmetro e 0.3 cm de altura, presos por uma goma alcatira e cobertos com talco comum de maneira a não deixar visível qualquer parte da superfície do tecido. O conjunto goma, rolha e tecido foram imersos em nitrogênio líquido (-180⁰) durante 20 segundos. Logo após, os blocos congelados foram acondicionados em um freezer -80°C e cortados em criostato de maneira seriada a 22°C.

A bateria histoquímica incluía eosina, hematoxilina e o tricrômico de Gomori modificado, em que se observa proliferação mitocondrial. Tratando-se de estudo referente à patologia neuromuscular, estas rotinas são normais em todas as biópsias, segundo Dubowitz & Brooke(1987). Assim, tal método é considerado bastante eficiente na análise metabólica do tecido cardíaco.

3.11 Análise dos Dados

As análises dos dados foram realizadas de acordo com a finalidade de cada comparação, bem como a distribuição dos dados. Assim, utilizamos o teste t de *Student* para comparação entre dois grupos diferentes e t de *Student* pareado quando as análises que envolveram o mesmo grupo em duas situações diferentes. Já para comparações com mais de dois grupos, foi utilizado o teste de variância bifatorial Anova de uma via e Anova de uma via com medidas repetidas quando o mesmo parâmetro foi analisado em momentos distintos. Em todas as análises consideramos diferenças significativas quando o $p < 0,05$ e pós-teste de Tukey quando utilizados os testes de variância bifatorial.

4. RESULTADOS

4.1 Confirmação da reorganização das fibras musgosas.

No modelo da pilocarpina, a análise comportamental é de grande importância visto que o estabelecimento do período crônico depende necessariamente do aparecimento de uma crise espontânea. Porém, este modelo apresenta alterações anatomo-patológicas bastante características. Dentre elas, a reorganização das fibras musgosas do hilo do giro dentado é bastante evidente. Isto nos motivou a analisar se tal alteração estava presente em nossos animais pertencentes aos grupos agudo, silencioso e crônico.

Dessa forma e como já esperado, tal alteração só foi encontrada nos animais do grupo crônico (Figura 4).

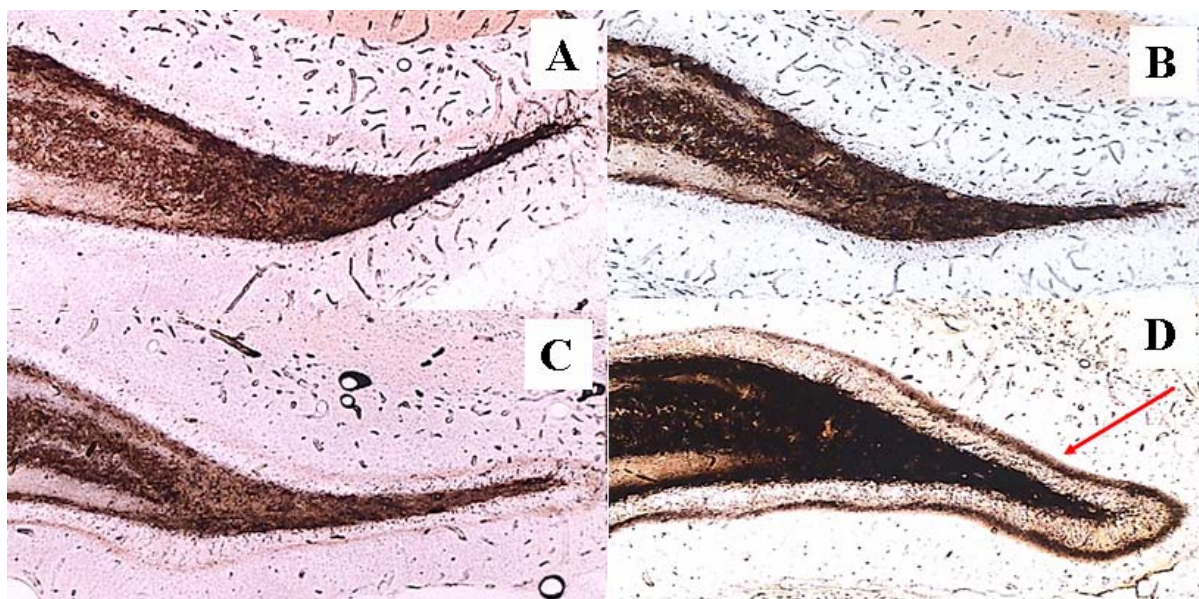


Figura 4 – Fotomicrografia (40X) do hipocampo dorsal mostrando a marcação de neo TIMM na região do hilo do giro dentado nos grupos controle (A), agudo (B), silencioso (C) e crônico (D). Note a intensa marcação de reorganização das fibras musgosas presente apenas nos ratos do grupo crônico

4.2 Frequência Cardíaca e Traçado Eletrocardiográfico: Comparação entre os Grupos.

Foram analisadas as frequências cardíacas de repouso para o mesmo período do dia dos ratos dos grupos controle, agudo, silencioso e crônico. Para isso, foi selecionado no sinal de cada animal um período de cinco minutos o qual foi subdividido em janelas de cinco segundos, dos quais obtínhamos a média. Com isso, as médias de todas as janelas foram consideradas a frequência cardíaca média de repouso de cada animal. Os resultados mostraram que a frequência cardíaca de repouso dos animais do grupo agudo é maior (459 ± 46 bpm), quando comparada aos demais grupos.

Os animais do grupo crônico apresentaram uma frequência cardíaca média (364 ± 17 bpm) maior quando comparada ao grupo controle (335 ± 26 bpm). Os dados estão demonstrados na figura 5.

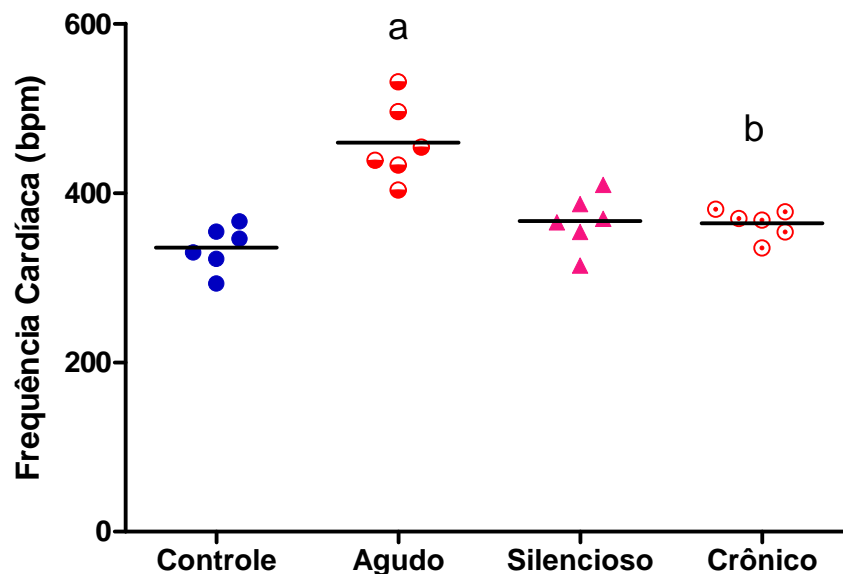


Figura 5 – Frequência cardíaca média dos ratos dos grupos controle, agudo, silencioso e crônico. A letra **a** indica que a média deste grupo difere de todas as outras enquanto **b** indica que a média do grupo crônico difere da média do grupo controle (one way Anova com pós teste de Tukey, $p < 0,05$).

A tabela 1 mostra os valores médios e os desvios padrão dos intervalos PR, complexos QRS, intervalos QT e intervalos QT corrigidos. Os complexos QRS dos animais do grupo

agudo e crônico foram maiores quando comparados aos demais grupos. Em relação ao intervalo QT, os animais do grupo controle apresentaram valores maiores que os demais grupos. Porém, quando este intervalo foi corrigido pela frequência cardíaca, não houve diferença.

Tabela 1 –mostra os valores médios \pm desvios padrão dos valores do intervalo PR, complexo QRS, intervalo QT e intervalo QT corrigido (QTc) dos ratos dos grupos controle, agudo, silencioso e crônico.

	Controle	Agudo	Silencioso	Crônico
Intervalo PR (ms)	48 \pm 4	48 \pm 5	47 \pm 4	48 \pm 2
Complexo QRS (ms)	28 \pm 3	31 \pm 1	30 \pm 2	32 \pm 1
Intervalo QT (ms)	63 \pm 2	57 \pm 3	60 \pm 2	75 \pm 14
Intervalo QTc (s)	0,151 \pm 0,008	0,157 \pm 0,007	0,156 \pm 0,008	0,181 \pm 0,03

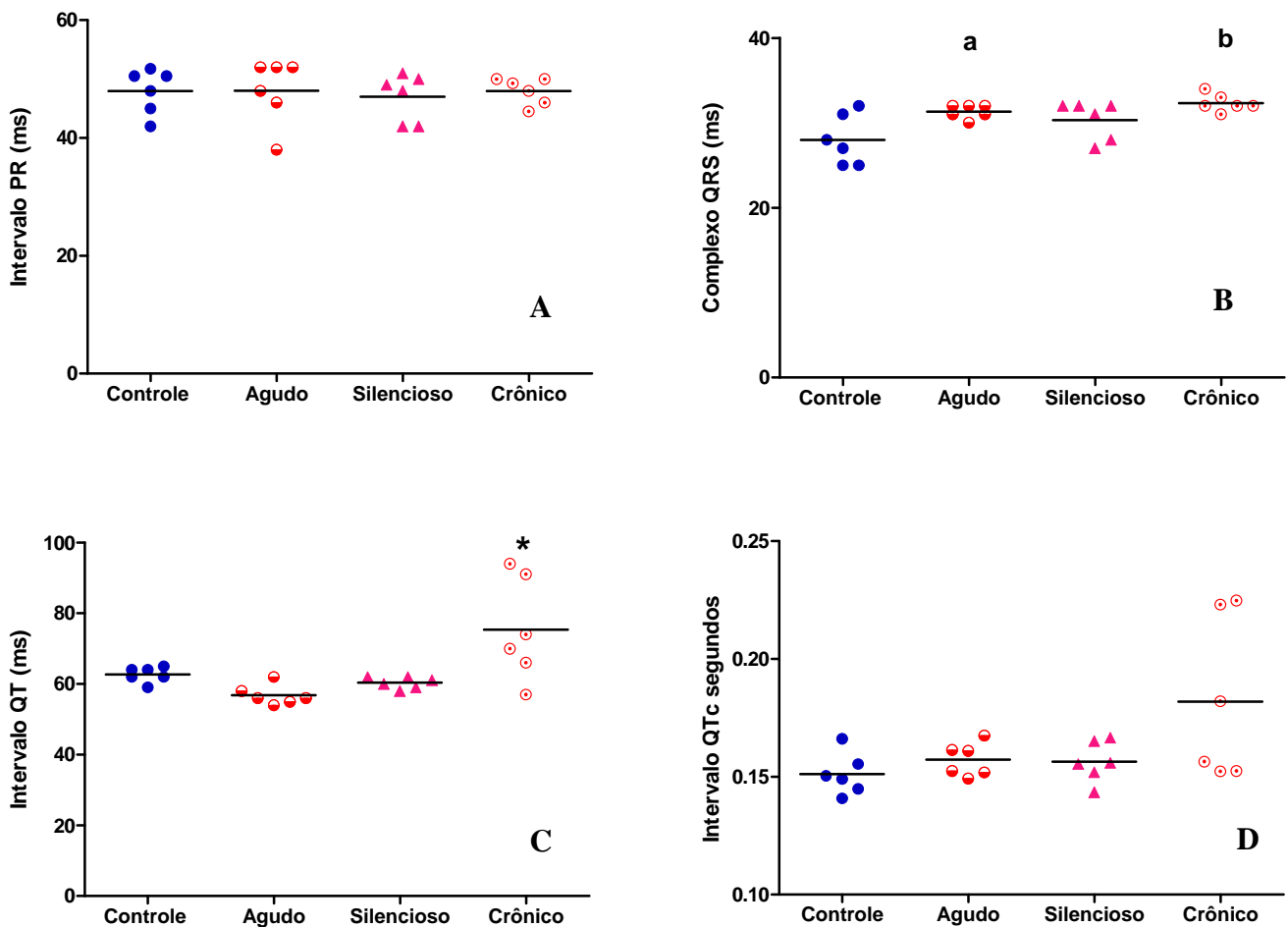


Figura 6 - os gráficos A, B, C e D representam os valores individuais e as médias, para cada grupo, do intervalo PR, complexo QRS, intervalo QT e intervalo QT corrigido respectivamente. Em B as letras a e b mostram diferença estatística em relação ao grupo controle e silencioso, enquanto em C o asterisco indica diferença entre os demais grupos.

4.2.1 Variabilidade da Frequência Cardíaca

As análises de variabilidade da frequência cardíaca foram realizadas apenas nos animais dos grupos controle e crônico. Este fato se deve as condições impostas aos demais grupos (uso de drogas com ação nos mecanismos de controle hemodinâmico e manipulação diária para nutrição e hidratação). Períodos de cinco minutos foram selecionados dos registros dos ratos tanto do grupo controle quanto do crônico. Selecionamos trechos do sinal com grande estabilidade e baixos níveis de artefatos. Também foi respeitado o período do dia e em todos os casos escolhemos o período da tarde como o padrão das análises. As análises foram realizadas tanto no domínio do tempo (SDNN e RMSSD) quanto no domínio da frequência (TP, Lf, Hf, Lf/Hf). Assim, as médias dos intervalos RR selecionados para os grupos controle e crônico foram 174 ± 10 ms e 165 ± 16 ms, respectivamente.

4.2.1.1 Domínio do Tempo

4.2.1.1.1 SDNN

Não houve diferença entre as médias de SDNN quando comparados grupo controle e grupo crônico. No grupo crônico a média foi $6,3 \pm 3$ ms e no grupo controle o valor médio de SDNN foi $8,4 \pm 2$ ms (Figura 7).

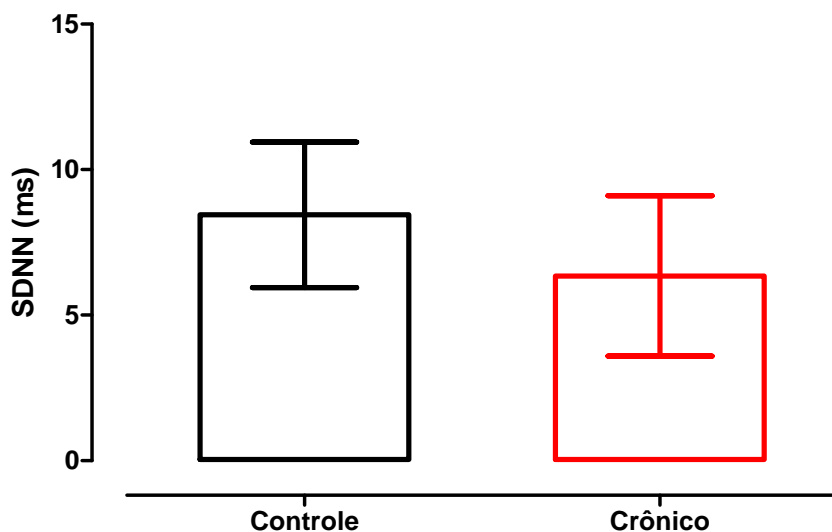


Figura 7 – O gráfico mostra as médias e os desvios padrão do SDNN dos ratos do grupo controle e crônico.

4.2.1.1.2 RMSSD

Em média, os valores de RMSSD (Figura 8) não foram diferentes quando comparados os grupos controle ($4,8 \pm 1$ ms) e crônico ($4,4 \pm 2$ ms) $p = 0,68$ no teste t Student.

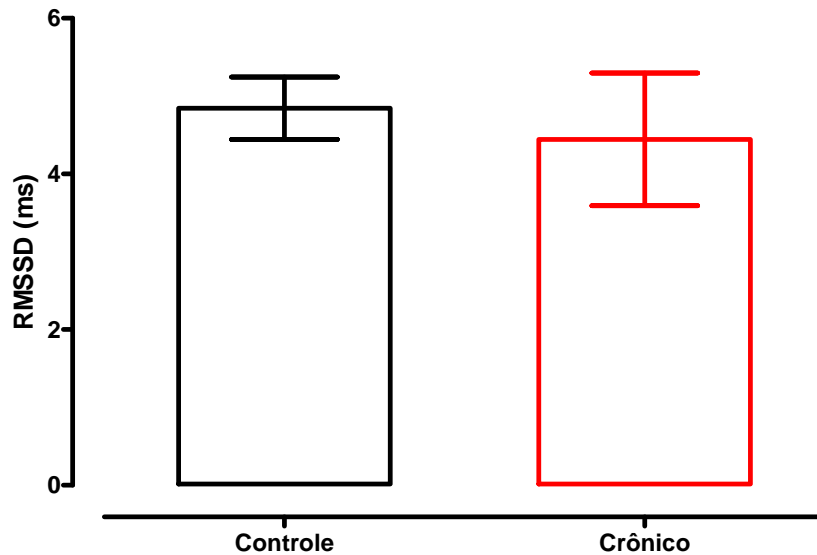


Figura 8 – O gráfico mostra as médias e os desvios padrão dos valores RMSSD dos ratos do grupo controle e dos ratos do grupo crônico.

4.2.1.2 Domínio da Frequência

4.2.1.2.1 Potência Total

No domínio da frequência, a potência total teve média maior no grupo crônico ($50,4 \pm 48$ ms^2) quando comparado aos animais pertencentes ao grupo controle ($18,1 \pm 12$ ms^2), no entanto, a análise estatística não apontou diferença entre tais médias (Figura 9).

Vale ressaltar que, dos valores de potencia total utilizados, foram subtraídos todos os espectros com frequências menores que 0,02 Hz (frequência muito baixa).

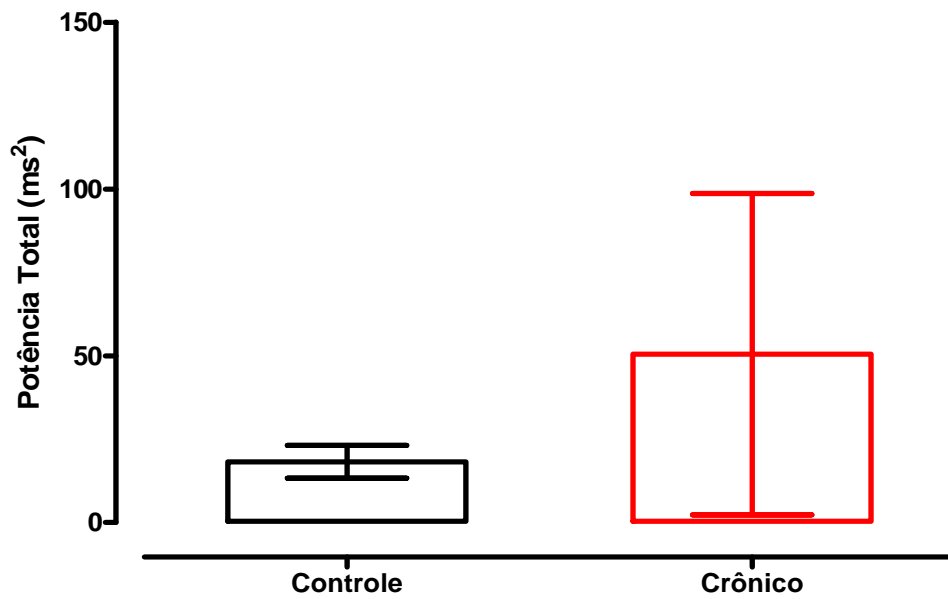


Figura 9 – Médias e desvios padrão da média da potência total dos ratos dos grupos controle e crônico.

4.2.1.2.2 Lf normalizado e Hf normalizado

Em seguida, avaliamos os valores Lf e Hf normalizados em relação a potencia total. As figuras 10A e 10B trazem as médias baixas frequências e altas frequências para os grupos controle e crônico.

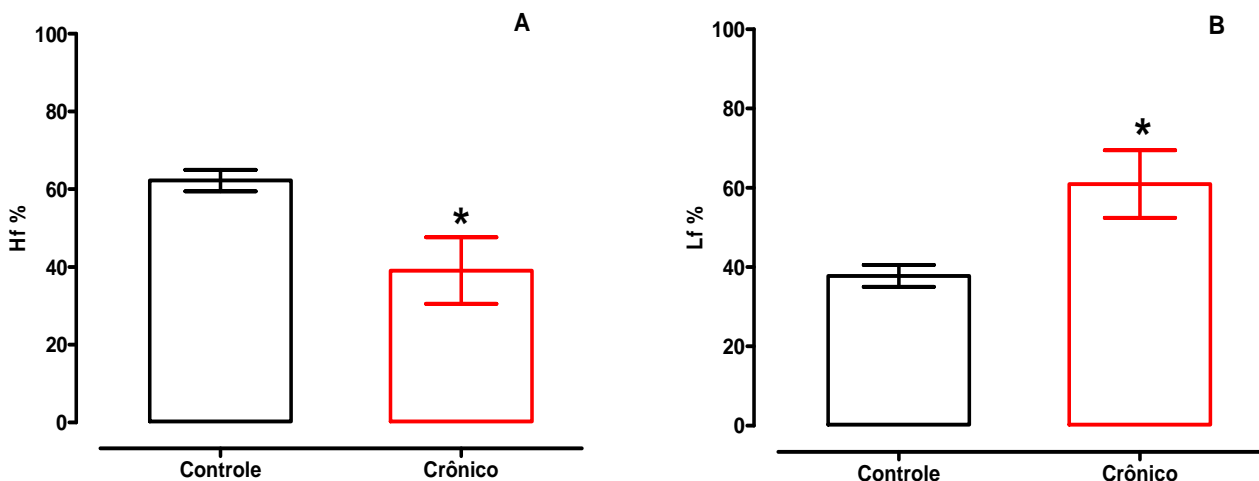


Figura 10 A e B – O gráfico A mostra os valores médios e os desvios padrão normalizados a partir da potencia total de altas frequências para o grupo controle ($62,2 \pm 6$ %) e grupo crônico ($39,0 \pm 20$ %) e o gráfico B mostra as médias e os desvios padrão da fração de baixas frequências para o grupo controle ($37,7 \pm 6$ %) e grupo crônico ($60,9 \pm 20$ %). O asterisco aponta diferença estatística para $p < 0.05$.

4.2.1.2.3 Razão Lf/Hf X 100

A razão entre baixa frequência e alta frequência também aponta para valores maiores (221 ± 153) nos ratos do grupo crônico quando comparados ao grupo controle (61 ± 17) $p < 0,05$ (Figura 11).

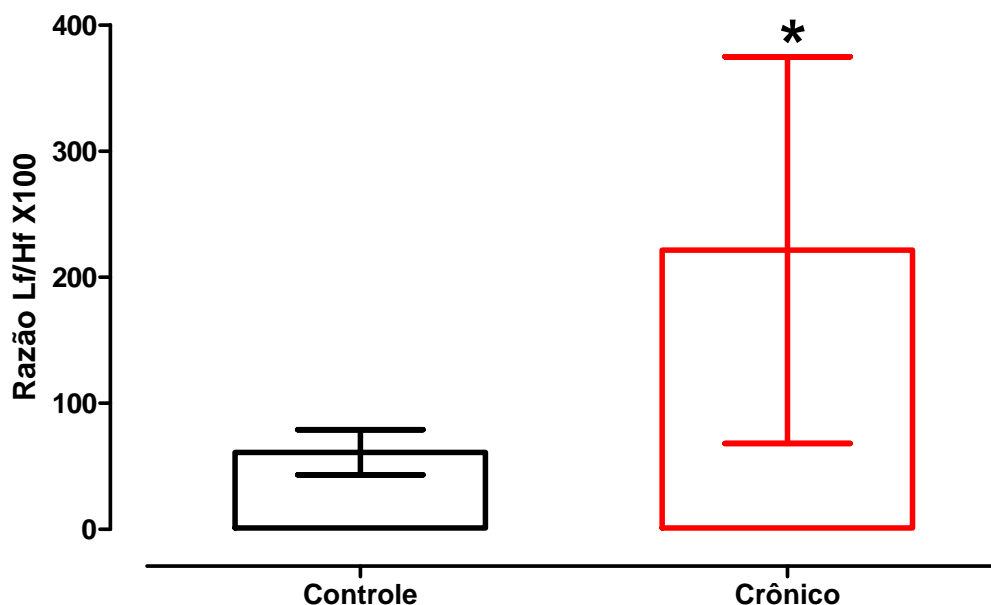


Figura 11 – O gráfico mostra as médias e os desvios padrão da Lf/Hf X 100 dos ratos do grupo controle e do grupo crônico. (*) as médias dos dois grupos são diferentes de acordo com o teste t de Student para $p < 0,05$.

4.3.1 Frequência Cardíaca e Traçado Eletrocardiográfico: análise e comparação no momento da crise, nos períodos próximos à crise, no período interictal.

De trinta crises registradas, apenas quinze estavam adequadas para todas as análises. Isso se deve a presença de artefatos nos registros que impossibilitavam quaisquer análises.

Na maioria das crises (87%), os animais estavam dormindo nos instantes que as precediam. A duração média das crises foi de 52 ± 24 segundos e todas foram classificadas como crises parciais complexas com generalização secundária. As alterações mais intensas de ritmo cardíaco e traçado eletrocardiográfico se iniciavam em média 8 ± 5 segundos após o

início das crises e perduravam em torno de 15 segundos, variando de 8 a 22 segundos



Figura 12 – Exemplo de trecho do traçado eletrocardiográfico típico encontrado no momento das crises, a área destacada mostra extra-sístoles ventriculares.

A principal alteração de ritmo cardíaco encontrada em todas as crises foi a bradicardia sinusal, a qual aumentava sua intensidade progressivamente, sendo que o mínimo valor atingido em média foi de 128 ± 37 bpm, o que representa uma queda de 75% na frequência cardíaca pré-ictal, Essa frequência mínima era atingida aproximadamente 11 ± 7 segundos após o início das crises. Em 90% das crises foram observadas extra-sístoles supra-ventriculares e ventriculares isoladas.

Para avaliar o padrão de frequência cardíaca antes, durante e após a crise epiléptica, foram selecionados todos os intervalos RR de 10 minutos antes até 10 minutos após as crises, dos quais foram feitas médias a cada cinco segundos. A figura 13 mostra a disposição das médias ao longo de todo o tempo avaliado.

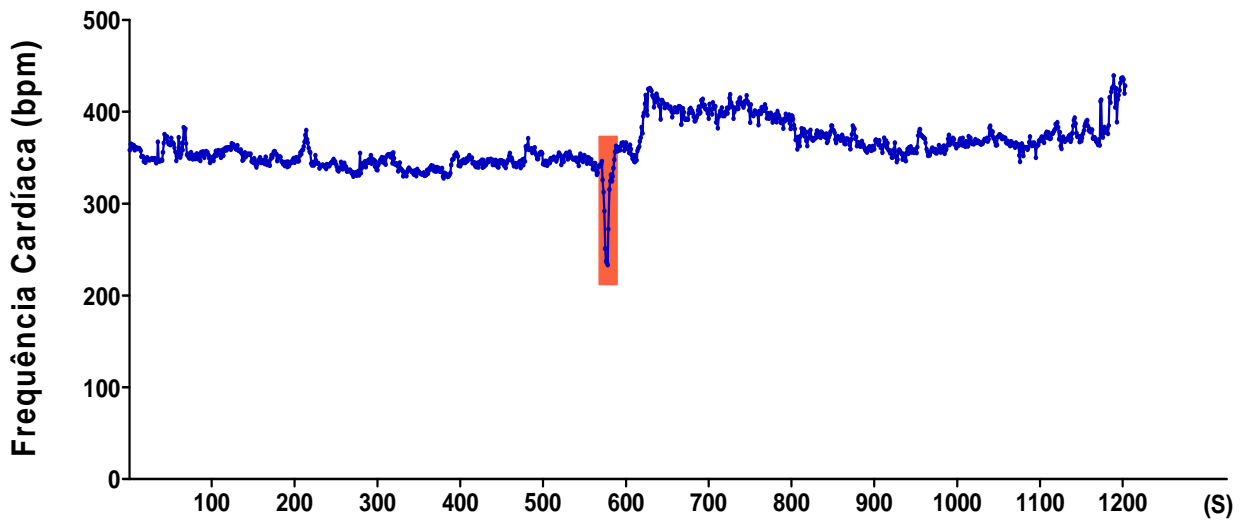


Figura 13 – Média da frequência cardíaca a cada segundo dos ratos com epilepsia 10 minutos antes, durante e 10 minutos depois das crises epiléticas. A região destacada representa o período médio de duração da crise e a média, a cada segundo, da menor frequência cardíaca atingida durante os períodos de bradicardia ictal.

Nesse sentido, fizemos uma análise da frequência cardíaca nos períodos pré e pós-ictais. De modo diferente da análise anterior, não foi incluído o período de crise. A frequência cardíaca foi determinada a partir da média de todos os intervalos RR contida nos 30 minutos anteriores à crise e comparada à média daqueles contidos nos 30 minutos posteriores. Os resultados claramente demonstram que a frequência cardíaca após é maior (365 ± 33 bpm) quando comparada a anterior (347 ± 22 bpm). Porém, quando analisados a cada dez minutos, não houve diferenças entre as médias (figura 14 A). Além disso, também foi realizada a análise a cada dez minutos dos períodos mais distantes até os mais próximos da crise (valores descritos na tabela 2 e na figura 14 B).

Tabela 2– Médias e desvios padrão dos valores da frequência cardíaca a cada 10 minutos antes e após as crises.

	Pré ictal (média \pm desvio padrão)			Pós ictal (média \pm desvio padrão)		
	30-20	20-10	10-0	0-10	10-20	20-30
FC (bpm)	356 ± 34	347 ± 33	343 ± 21	365 ± 33	368 ± 36	370 ± 43

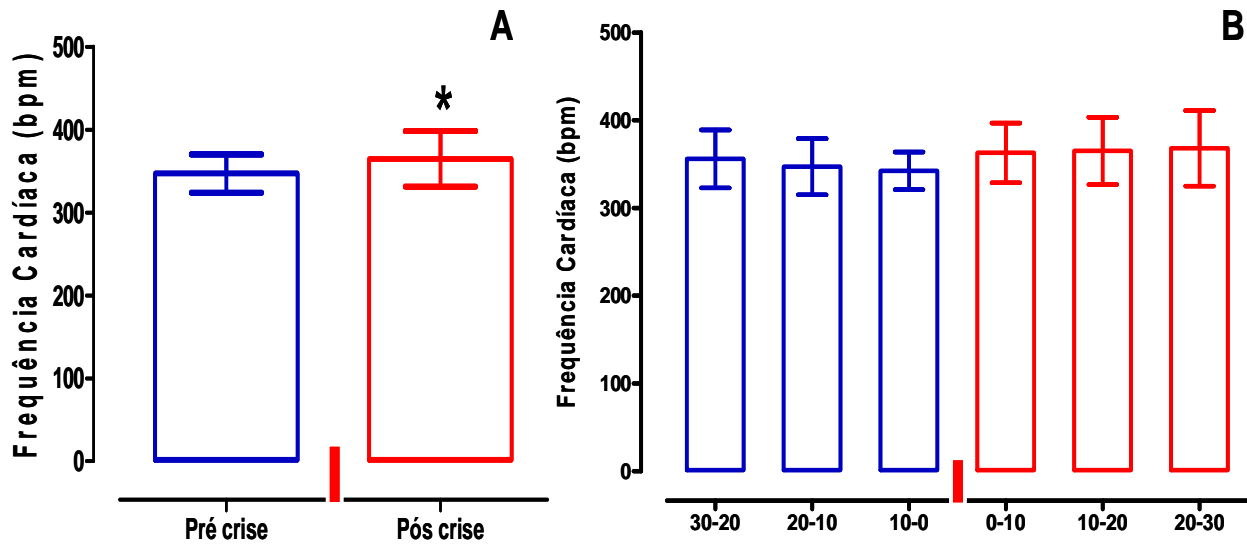


Figura 14 – O gráfico mostra a média e os desvios padrão da frequência cardíaca 30 minutos antes e trinta minutos depois da crise epilética. A barra vermelha representa a crise.

4.3.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca nos Períodos Próximos à Crise

4.3.2.1 Domínio do Tempo

4.3.2.1.1 SDNN e RMSSD

Foram medidos SDNN e RMSSD dos 30 minutos pré e pós ictais. Quando comparadas às médias, tanto de SDNN quanto de RMSSD, não foram significativamente diferentes segundo o teste t Student pareado para $p < 0,05$. Dos 30 minutos pré e pós ictal, ainda foi realizada a análise do SDNN e RMSSD a cada dez minutos e não detectamos diferenças entre as médias (teste one way Anova de medidas repetidas e pós teste de Dunnet para $p < 0,05$). Assim, os valores médios de SDNN encontrados foram $11,6 \pm 5$ ms para o período pré-ictal e $13,0 \pm 5$ ms para o período pós-ictal (Figura 15A). Salientamos que os resultados da análise a cada dez minutos estão dispostos na tabela 3 e plotados na figura 15B,

Tabela 3 – Médias e desvios padrão dos valores de SDNN a cada 10 minutos antes e após as crises.

	Pré ictal (média ± desvio padrão)			Pós ictal (média ± desvio padrão)		
	30-20	20-10	10-0	0-10	10-20	20-30
SDNN (ms)	9,4 ± 6	9,7 ± 5	10,7 ± 5	12,1 ± 5	10,5 ± 5	11,4 ± 6

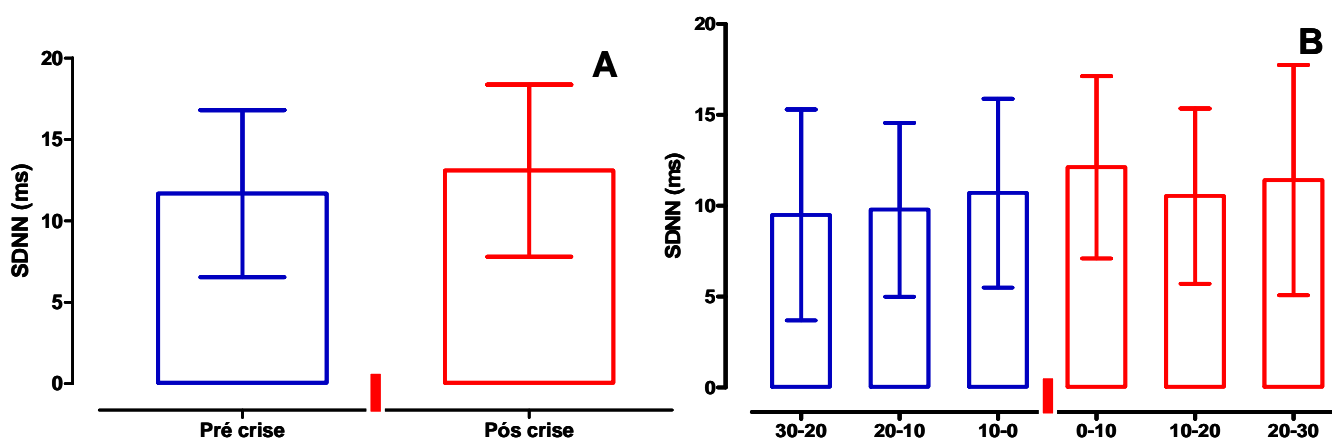


Figura 15 - Médias e desvios padrão do SDNN dos períodos pré e pós ictais (A) e médias e desvios padrão do SDNN a cada dez minutos dos períodos pré e pós ictais (B). A barra vermelha no eixo X representa a crise epiléptica.

Os valores de RMSSD para o período pré-ictal foi de $3,9 \pm 1,8$ ms e para o período pós-ictal $4,1 \pm 1,4$ ms (Figura 16A). Assim, os resultados da análise a cada dez minutos estão dispostos na tabela 4 e plotados na figura 16B.

Tabela 4 – Médias e desvios padrão dos valores de RMSSD a cada 10 minutos antes e após as crises.

	Pré ictal (média ± desvio padrão)			Pós ictal (média ± desvio padrão)		
	30-20	20-10	10-0	0-10	10-20	20-30
RMSSD (ms)	3,4 ± 1	3,4 ± 1	3,8 ± 2	3,8 ± 1	3,8 ± 1	4,0 ± 1

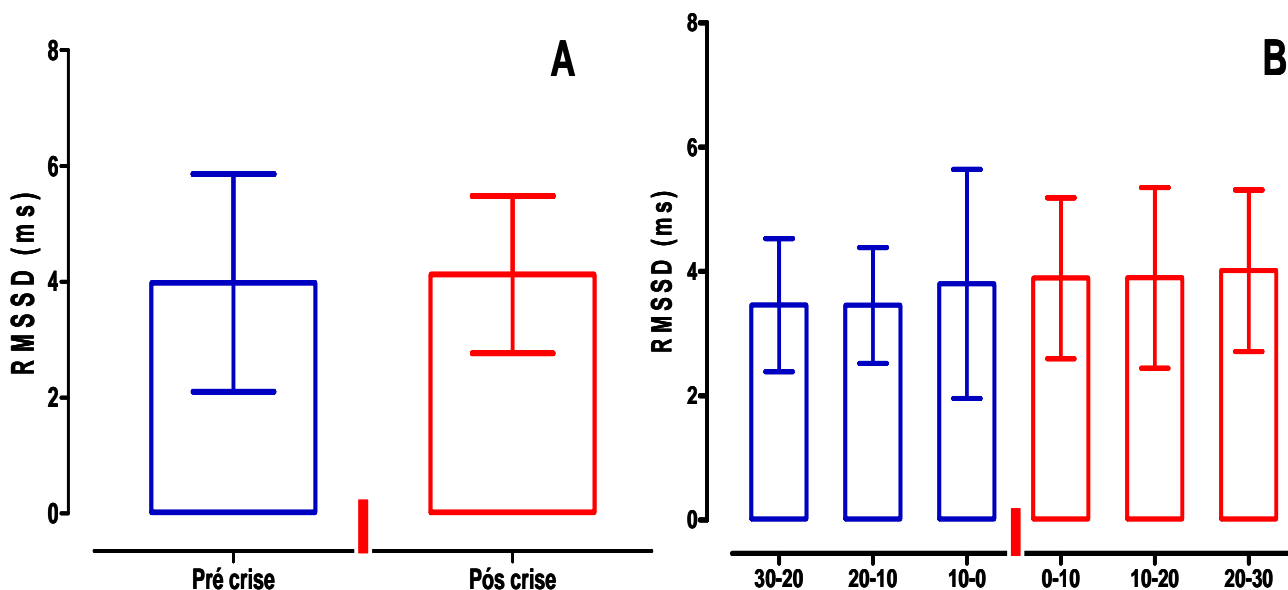


Figura 16 - Médias e desvios padrão do RMSSD dos períodos pré e pós ictais (A) e médias e desvios padrão do RMSSD a cada dez minutos dos períodos pré e pós ictais (B). A barra vermelha no eixo X representa a crise epiléptica.

4.3.2.1.2 Domínio da Frequência

As análises no domínio da frequência (Potência Total, Lf e Hf normalizadas e razãoLf/Hf) também foram realizadas. Consideramos um período total de trinta minutos antes e após as crises e também a cada dez minutos.

4.3.2.1.2.1 Potência Total

Os períodos totais não foram estatisticamente diferentes quando comparados os valores de potência total pré-crisis $22,9 \pm 17 \text{ ms}^2$ com pós-crisis $26,7 \pm 13 \text{ ms}^2$. Da mesma forma, não houve diferença quando a potência total foi analisada a cada dez minutos. Os valores de potência total a cada dez minutos antes e após estão representados na tabela 5 e a representação gráfica de ambas as análises na figura 17.

Tabela 5– Médias e desvios padrão dos valores de Potência Total a cada 10 minutos antes e após as crises.

	Pré ictal (média ± desvio padrão)			Pós ictal (média ± desvio padrão)		
	30-20	20-10	10-0	0-10	10-20	20-30
Potência Total						
(ms)	20,4±12	18,3±9	17,4±9	24,5±16	24,2±14	26,1±15

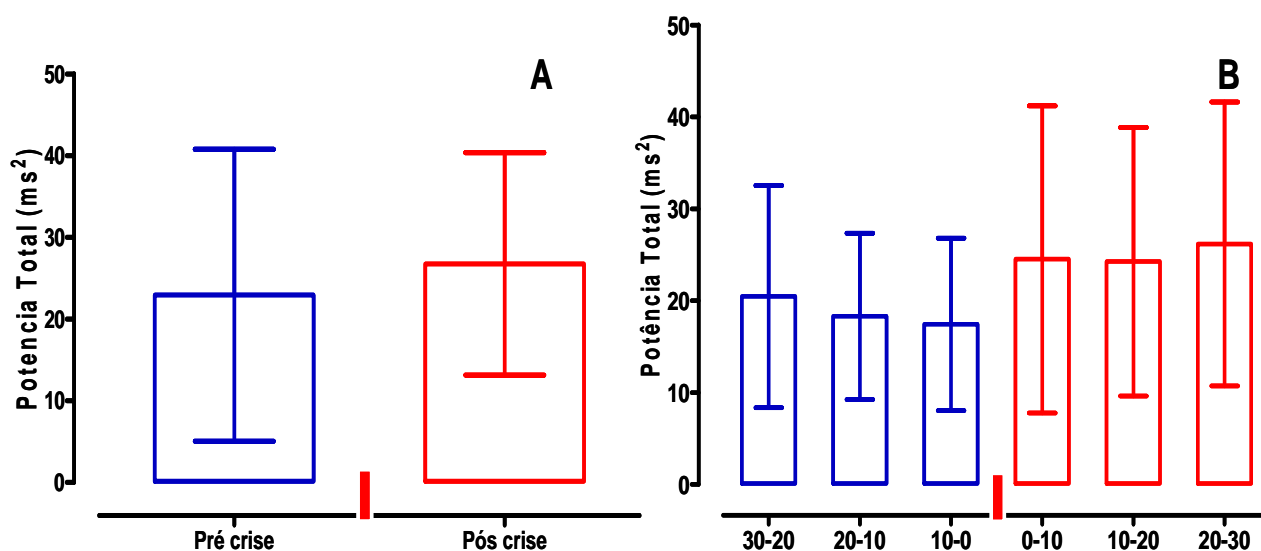


Figura 17 – médias e desvio padrão da potência total das análises realizadas em trinta minutos antes e após as crises (A) e a cada dez minutos antes e após as crises (B).

4.3.2.1.2.2 Baixa Frequência Normalizada

Como a ocorreu na potência total, os valores de baixa frequência normalizada dos períodos totais não foram estatisticamente diferentes quando comparados pré-criSES $37 \pm 9\%$ com pós-criSES $34 \pm 5\%$. Também não houve diferença quando a baixa frequência normalizada foi analisada a cada dez minutos. Os valores a cada dez minutos antes e após estão representados na tabela 6 e a representação gráfica de ambas as análises na figura 18.

Tabela 6– Médias e desvios padrão dos valores de Baixa Frequência Normalizada a cada 10 minutos antes e após as crises.

	Pré ictal (média ± desvio padrão)			Pós ictal (média ± desvio padrão)		
	30-20	20-10	10-0	0-10	10-20	20-30
Baixa						
Frequência %	38,5 ± 10	39 ± 12	34,5 ± 9	33 ± 7	35,6 ± 9	38 ± 9

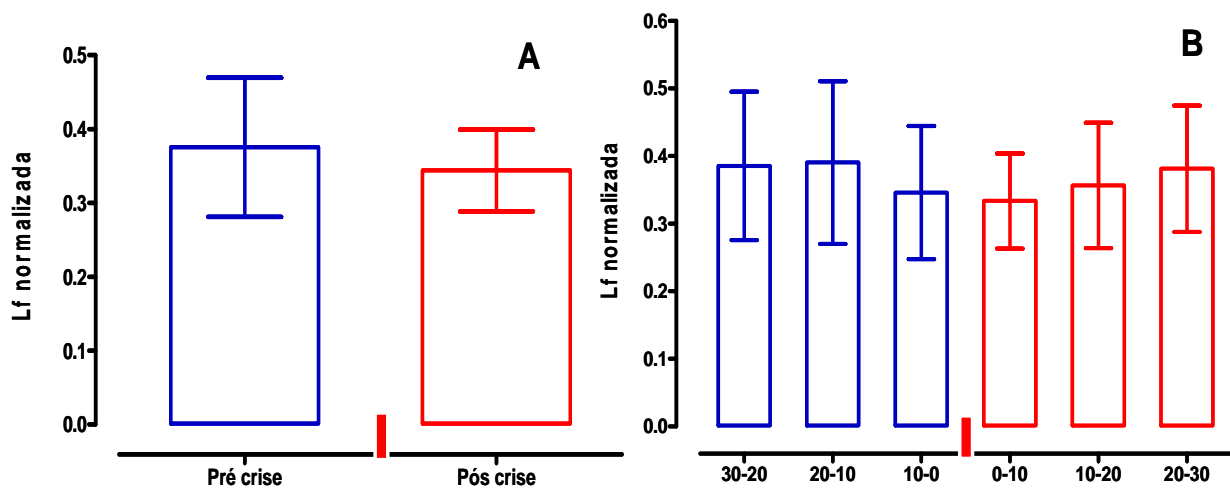


Figura 18 - médias e desvio padrão da baixa frequência normalizada das análises realizadas em trinta minutos antes e após as crises (A) e a cada dez minutos antes e após as crises (B).

4.3.2.1.2.3 Razão Lf/Hf x 100

Quando comparados os períodos totais, trinta minutos antes e após as crises, os resultados mostram que a razão é menor (55 ± 13) após as crises quando comparados aos resultados pré-crisis (66 ± 24), sugerindo que o equilíbrio entre simpático e parassimpático se altera, apontando para maior atuação parassimpática após as crises. Porém, quando analisada a cada dez minutos, não foram encontradas diferenças. Os valores a cada dez minutos antes e após estão representados na tabela 7 e a representação gráfica de ambas as análises na figura 19.

Tabela 7 – Médias e desvios padrão dos valores da razão Lf/Hf x 100 a cada 10 minutos antes e após as crises.

	Pré ictal (média ± desvio padrão)			Pós ictal (média ± desvio padrão)		
	30-20	20-10	10-0	0-10	10-20	20-30
Razão Lf/Hf x 100						
100	72,5 ± 31	69,9 ± 30	59,1 ± 24	55,7 ± 14	59,5 ± 36	65,2 ± 23

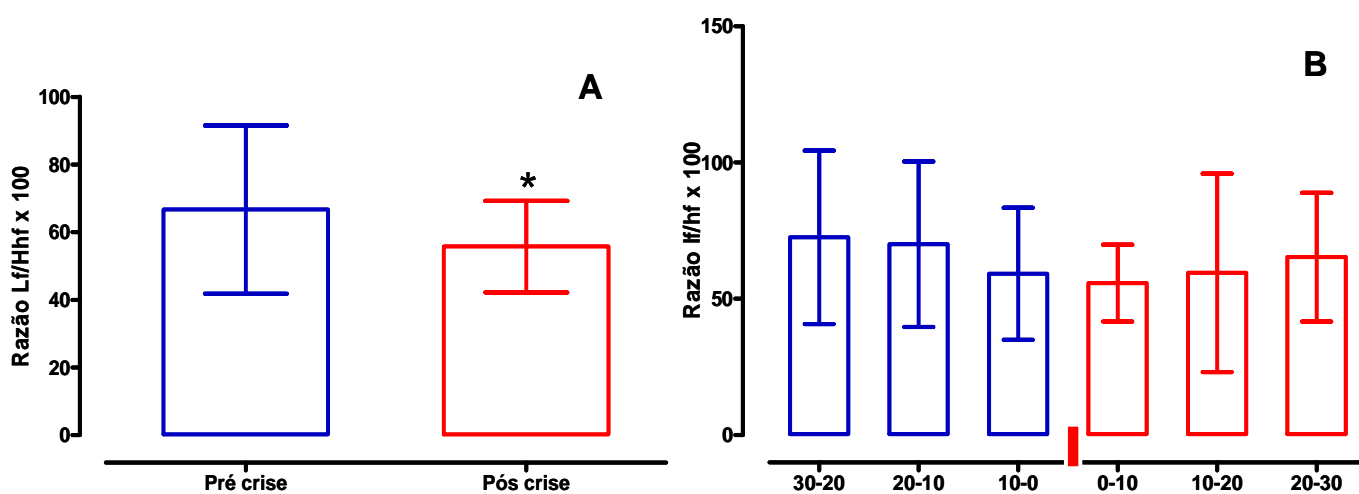


Figura 19 - médias e desvio padrão da razão Lf/Hf x 100 das análises realizadas em trinta minutos antes e após as crises (A) e a cada dez minutos antes e após as crises (B).

4.4 Análise Histoquímica do Tecido Cardíaco

Foram submetidos à análise hhistoquímica os animais de todos os grupos. Tais análises revelaram que todos os animais do grupo crônico apresentam áreas de necrose com reação macrofágica e proliferação mitocondrial. No grupo controle, apenas um rato apresentou as mesmas alterações. Nos ratos do grupo agudo, apenas um animal apresentou apagamento da eosinofilia isoladamente, enquanto em outros três casos foi possível observar apagamento da eosinofilia com dilatação vascular. Já nos animais do grupo silencioso, apenas um caso foi encontrada necrose com macrofagia e discreta proliferação mitocondrial. Em outro caso deste grupo foram observadas 20% de centralizações nucleares sem necrose propriamente dita.

As figuras 20 e 21 mostram as marcações com eosina-hematoxilina, tricrômico de gomori e succino-desidrogenase respectivamente.

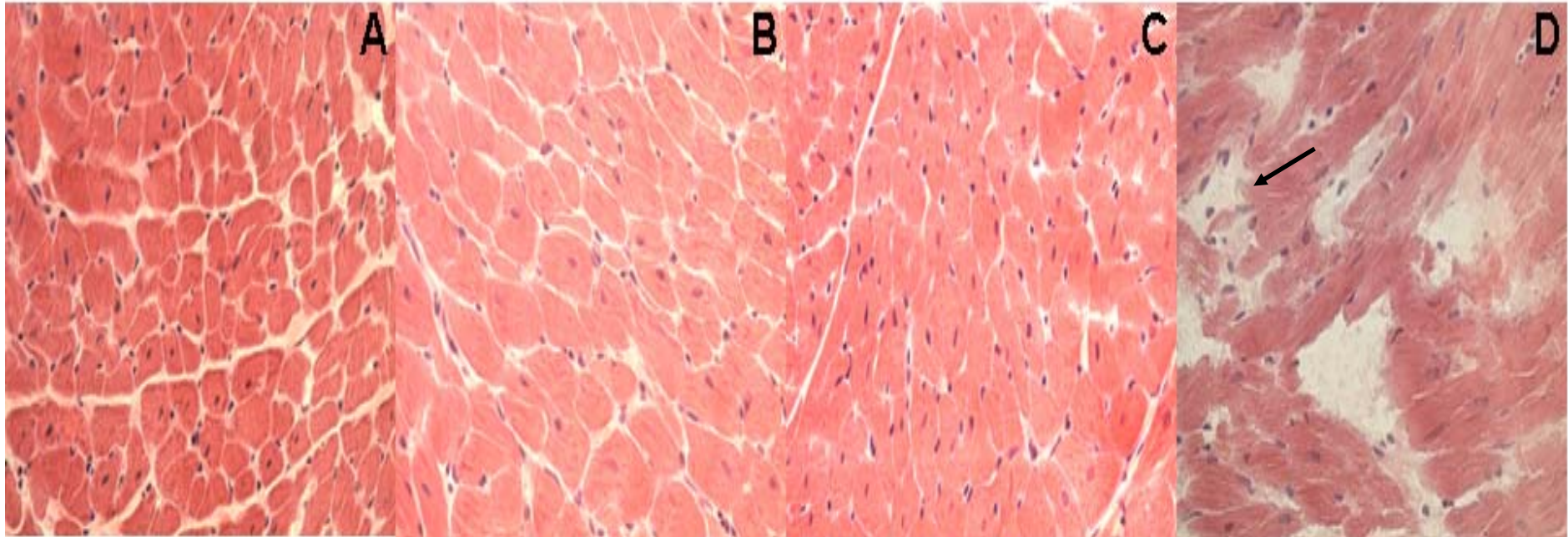


Figura 20 – Fotomicrografia (40X) da análise histoquímica (eosina e hematoxilina) realizada nos ratos do grupo controle (A), agudo (B), silencioso (C) e crônico (D). Note em a presença de necrose e reação macrofágica em D (seta), esta alteração ocorreu em 100% dos casos deste grupo.

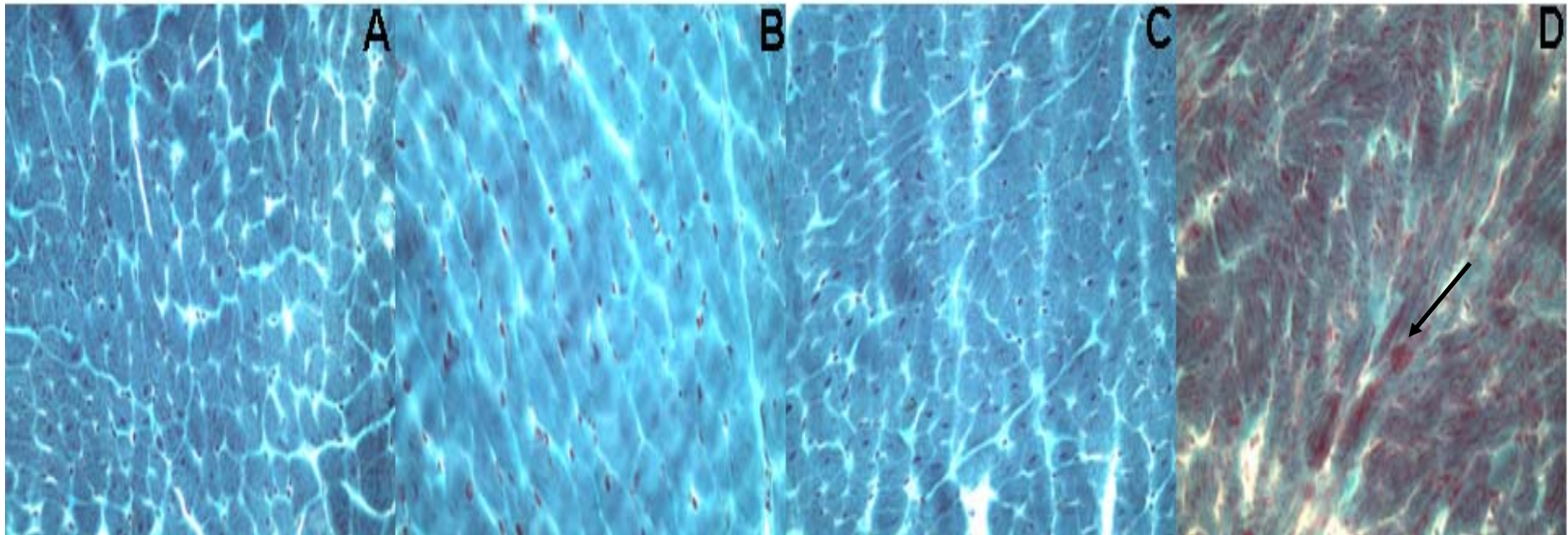


Figura 21 – Fotomicrografia (40X) da análise histoquímica (Tricrômico de Gomori) realizada nos ratos do grupo controle (A), agudo (B), silencioso (C) e crônico (D). Note em a presença de proliferação mitocondrial evidenciada pela coloração avermelhada em D (seta), esta alteração ocorreu em 100% dos casos deste grupo.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar os seguintes parâmetros cardíacos no modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina: traçado eletrocardiográfico e modulação autonômica durante e no período entre as crises epiléticas como também, avaliar a morfologia do tecido cardíaco de animais com epilepsia. Para isso, utilizamos métodos que permitiram o monitoramento do eletrocardiograma dos ratos 24 horas por dia, possibilitando análises da forma, ritmo, frequência e modulação autonômica nos períodos livres, próximos e durante as crises epiléticas. Além disso, também foi possível estudar os parâmetros cardíacos durante o desenvolvimento do modelo, ou seja, durante as três fases que determinam a instalação da epilepsia crônica. Como citado na introdução deste trabalho, existem vários fatores de risco responsáveis pelo fenômeno da morte súbita e inesperada nas epilepsias (TOMSON et al., 2008). Uma análise minuciosa realizada pelo Professor John Hughes de Chicago destacou que determinados fatores de risco ocupam lugar de destaque neste cenário: refratariedade ao tratamento farmacológico, alta frequência de crises epiléticas, presença de crises tonico-clônicas generalizadas, tempo de epilepsia, idade dos indivíduos e politerapia (HUGHES 2009). Com relação aos possíveis mecanismos causais da morte súbita e inesperada nas epilepsias, acredita-se atualmente que possíveis anormalidades cardiovasculares durante as crises epiléticas podem ser diretamente responsáveis pela morte dos indivíduos com epilepsia (STÖLLBERGER & FINSTERER, 2004). Nesse sentido, os resultados experimentais encontrados em nosso trabalho nos permitem avaliar e discutir os aspectos citados acima, isto é, a relação entre fatores de riscos e os mecanismos causais da morte súbita e inesperada nas epilepsias.

Primeiramente, é importante salientarmos que todos os animais do grupo crônico em nosso trabalho apresentaram reorganização das fibras musgosas do giro dentado, sendo este fator determinante para a geração de crises recorrentes. No modelo da pilocarpina, um estudo clássico do nosso laboratório reporta uma alta variação no que se refere à frequência de crises. Nesse estudo, alguns grupos de animais apresentavam alta frequência (700 crises em um ano) e grupos com baixa frequência (400 crises em um ano) (ARIDA et al., 1999). Como esses dados experimentais de 1999 refletem com bastante fidedignidade a epilepsia do lobo temporal de indivíduos refratários ao tratamento farmacológico, adotamos o tempo de epilepsia como parâmetro de padronização em nosso estudo. Outro fato interessante a ser

comentado é a relação idade/morte súbita. Como previamente descrito, a idade em que ocorre a maioria dos casos de morte súbita e inesperada nas epilepsias encontra-se na faixa dos 20 a 40 anos (TOMSON et al., 2008; STÖLLBERGER & FINSTERER, 2004). Assim, tivemos o cuidado com esse importante fator de risco e determinamos um tempo de dois meses de epilepsia para avaliarmos os animais em nosso estudo. Esse período correspondeu a 150 dias de vida do rato no momento das coletas de dados, que de certa forma, pode-se relacionar a faixa etária de maior pico de ocorrência de morte súbita em seres humanos com epilepsia.

5.1 Frequência Cardíaca e Traçado Eletrocardiográfico

A medida da frequência cardíaca média dos ratos de todos os grupos foi realizada e os resultados mostram que os animais do grupo agudo apresentaram frequência maior (o monitoramento foi realizado 2 horas após o início do *status epilepticus*) quando comparada às frequências dos ratos dos outros grupos. Percentualmente, os animais durante o *status epilepticus* apresentaram um aumento de 37% na frequência cardíaca em relação ao grupo controle. Esses dados estão de acordo com a literatura vigente, que também sugere a presença de taquicardia significativa durante o estado de mal epiléptico (SCORZA et al., 2008). Com relação ao grupo silencioso, a frequência cardíaca dos animais não se apresentou alterada quando comparada com os animais pertencentes ao grupo controle e crônico. Aparentemente, notamos que a distribuição de valores está mais próxima do observado no grupo crônico, porém, os ratos do grupo silencioso podem estar sobre forte influência do estresse, uma vez que nos dias seguintes ao período agudo se faz necessária a hidratação e alimentação forçada dos animais, o que poderia influenciar no tempo de adaptação do mesmo devido à intensa manipulação. Além disso, a característica deste grupo não permitiu que os animais fossem habituados ao local de medida da frequência cardíaca por um período prolongado. Esse fato também deve ser considerado e pode ter interferido nas medidas, elevando a média da frequência cardíaca desses animais.

No grupo crônico a média de frequência cardíaca foi maior quando comparada ao grupo controle. Esta diferença está de acordo com estudos anteriores de nosso grupo. Nestes estudos, a frequência cardíaca de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina foi medida *in vivo e in vitro*. Para as análises com o animal *in vivo* foi utilizado um aparato metodológico desenvolvido em nosso laboratório que permitia a livre movimentação do animal durante as coletas, sem que houvesse a necessidade de implante de eletrodos. Já para os experimentos *in*

vitro, utilizamos um sistema de Langendorff modificado, no qual monitorávamos frequência cardíaca e pressão ventricular. Os resultados *in vivo* do nosso estudo demonstraram que a frequência cardíaca média dos animais com epilepsia era maior quando comparada com os animais do grupo controle. Por outro lado, na situação *in vitro* não encontramos diferenças entre os grupos, tanto a frequência cardíaca quanto a pressão ventricular eram semelhantes entre os grupos controle e crônico (COLUGNATI et al., 2005). Frente a tais resultados, concluímos, naquele momento, que as alterações observadas estavam relacionadas a alterações da modulação cardíaca sem comprometimento intrínseco do coração (COLUGNATI et al. 2005). De forma interessante, nosso estudo corroborou com o clássico estudo de Drake et. al. (1993), que avaliaram os eletrocardiogramas de 75 pacientes com epilepsia durante o período interictal. Os autores demonstraram que tais pacientes apresentavam frequência cardíaca mais elevada quando comparada com indivíduos da mesma idade e sem patologia cardíaca e neurológica associada. Curiosamente, este trabalho ainda mostrou que os pacientes com crises parciais complexas apresentavam frequência cardíaca mais elevada quando comparada com os pacientes com crises generalizadas.

Em relação à forma do traçado eletrocardiográfico durante o período interictal em indivíduos com epilepsia, não existe um consenso na literatura atualmente. No presente trabalho, a única alteração relevante encontrada foi a presença de um complexo QRS mais longo apenas nos animais pertencentes ao grupo crônico. Esta alteração poderia sugerir atraso do sistema de condução e alargamento das câmaras ventriculares ou ambos (DHINGRA et al., 2005). Por outro lado, como o arranjo dos eletrodos implantados nos ratos nos dava apenas uma derivação elétrica do coração, determinar através do eletrocardiograma uma provável e específica alteração foi inviável. Além disso, mesmo se outras derivações fossem possíveis, ainda seria necessária a confirmação dos achados por outros métodos diagnósticos (ex. ecocardiograma), devido à baixa especificidade do eletrocardiograma em determinar alterações de câmaras cardíacas (LIBBY, 2007).

Na clínica cardiológica, um dos principais parâmetros para a predição de risco de arritmias severas é a duração do intervalo QT. O intervalo QT inclui todo o processo de despolarização e repolarização ventriculares (KLIGFIELD et al., 2003). Além disto, o intervalo QT oferece uma melhor visualização do que ocorre com toda a atividade elétrica ventricular, pois nele estão contidos o complexo QRS e a onda T. Na onda T, os terços mais próximos de seu ápice são aqueles considerados os mais vulneráveis, quando coincidem com

despolarizações prematuras, sendo capaz de gerar arritmias graves (taquicardia ventricular e torção de pontas), as quais têm uma grande probabilidade de evoluir para fibrilação ventricular, evento que geralmente precede a morte súbita cardíaca (TRANCHESI, 1972). Assim, como a duração do intervalo QT depende da frequência cardíaca, várias técnicas de correção foram testadas para permitirem, com mais precisão, a comparação entre sujeitos com frequências cardíacas distintas. Destas, a mais utilizada é a proposta por Bazett, na qual o QT é corrigido pela frequência cardíaca pela razão entre o intervalo QT (medido em segundos) pela raiz quadrada do intervalo RR (medido em segundos) (LIBBY, 2007). Em nosso estudo, demonstramos que os intervalos QT corrigidos não apresentaram diferenças entre os grupos analisados, embora pareça, devido à dispersão dos dados, que os animais com epilepsia (grupo crônico) apresentaram valores maiores. Obviamente, a necessidade de um número maior de animais seria necessário para confirmação desta informação.

Como previamente descrito, há vários estudos na literatura que buscam o entendimento da função cardíaca durante as crises epiléticas. Para isso, a maioria dos pesquisadores utiliza o monitoramento simultâneo do eletrocardiograma (ECG) e eletroencefalograma (EEG). Tais estudos sugerem que as crises epiléticas estão associadas a um aumento da frequência cardíaca (preferencialmente no momento da crise), mas tal alteração também foi descrita nos momentos que antecedem as crises epiléticas, como também por breves instantes após o evento ictal (OPHERK et. al., 2002; KEILSON et. al., 1987; NEI et. al., 2000). Seguindo essa linha de pensamento, o monitoramento concomitante do ECG/EEG de pacientes com epilepsia revelou a existência de arritmias (KEILSON et. al., 1987). Assim, a ocorrência de depressão do segmento ST e o prolongamento do segmento QT foram detectados nesses indivíduos (TAVENOR et. al., 1996; TIGARAN et. al., 2003). Em nosso estudo, também nos preocupamos com essa possibilidade metodológica de avaliação, Dessa forma, realizamos análises de VÍDEO-ECG no momento das crises epiléticas e nos períodos que antecederam as mesmas. No momento da crise, verificamos em todos os casos a ocorrência de bradicardia intensa, a qual se iniciava (em média) oito segundos após o início das crises observadas no vídeo. Além disso, as bradicardias tinham uma duração média de quinze segundos, sendo responsáveis por uma redução de até 80% da frequência cardíaca de base. Nossos dados estão de acordo com estudos experimentais prévios, isto é, a bradicardia no momento das crises epiléticas também é a alteração mais frequente no modelo do abramento elétrico da amígdala (GOODMAN et al., 1999; 1990). Em contrapartida, estudos clínicos não corroboram integralmente com os resultados encontrados em nosso

estudo. Diversos trabalhos com seres humanos descrevem que as bradiarritimas são mais raras, porém, parece haver um pior prognóstico para pacientes com epilepsia que apresentam tais alterações durante suas crises epiléticas (HOWELL & BLUMHARDT, 1989; EPSTEIN, SPERLING, O'CONNOR, 1992; LIEDHOLM & GUDJONSSON, 1992; DEVINKSY, PACIA, TATAMBHOTLA, 1997). É interessante comentarmos que nesses estudos clínicos, o monitoramento por vídeo EEG/ECG é realizado por períodos relativamente curtos. Isso poderia causar uma subestimação do evento encontrado (nesses casos, bradiarritimas) por parte dos pesquisadores envolvidos em tais estudos. Isso foi comentado e demonstrado recentemente através de um estudo com o monitoramento por *holter* de pacientes com epilepsia, no qual foi claramente verificado pelo menos um evento de bradiarritmia em todos os pacientes avaliados (HUGHES, 2009). Além disso, salientamos que uma das limitações de nosso trabalho foi o número reduzido de eletrodos e o intenso ruído presente no sinal no momento das crises, devido a intensa atividade muscular. A detecção sistemática e precisa de correntes de lesão constitui um objetivo de trabalhos futuros.

Para a análise do que ocorre precisamente nos instantes próximos às crises epiléticas, realizamos coletas trinta minutos antes e trinta minutos após as mesmas. Nesse sentido, os nossos resultados mostram que os animais apresentam taquicardia após as crises em relação à situação anterior ao evento ictal. Quando as médias são comparadas a cada dez minutos não há diferença estatística, mas aparentemente, a frequência cardíaca apresenta-se menor nos dez minutos que antecedem a crise. A frequência cardíaca média dos ratos do grupo crônico nos instantes próximos às crises apresenta valores menores daqueles utilizados para comparação com o grupo controle. Esta diferença talvez se explique, pois para a comparação com os outros grupos, foram selecionados trechos do registro onde os animais estavam acordados. Salientamos que as coletas realizadas nos grupos controle, agudo e silencioso foram realizadas com os animais acordados. A avaliação através do vídeo das crises epiléticas nos mostrou que as mesmas ocorreram em sua grande maioria (87%) durante o sono dos animais. Assim, podemos especular que a taquicardia pós-ictal está diretamente relacionada com o despertar do animal devido ao aparecimento da crise epilética. Além disso, também é descrito na literatura o aparecimento de apnéia central, hipoventilação e intensa atividade motora durante as crises epiléticas. Assim, a associação desses fatores à bradicardia ictal podem levar a alterações metabólicas, tais como redução na pressão de oxigênio plasmático e acidose metabólica, o que contribuiria para o aumento da frequência cardíaca pós-crise (HUGHES, 2009). Infelizmente, nosso protocolo experimental não permitia a coleta de

sangue arterial dos animais para avaliação gasométrica, o que seria de fundamental importância para a constatação de tal hipótese.

A origem anatômica da atividade epiléptica no SNC também é um aspecto interessante para ser abordado. Uma atividade epiléptica com origem na amígdala, giro do cíngulo e córtex insular tem sido relacionada com indução de arritmias como: taquicardia supraventricular, taquicardia sinusal, bradicardia sinusal, bloqueio átrio-ventricular e assístole. (TOMSON et al., 2008; DEVINSKY et al., 1994). Dessa maneira, como o hipocampo e a amígdala são estruturas do sistema límbico altamente conectadas entre si, poderemos sugerir que a perda neuronal e a reorganização sináptica existente na formação hipocampal dos animais com epilepsia no modelo da pilocarpina (MELLO et. al., 1993; CAVALHEIRO, 1995) podem ser um dos fatores responsáveis pelas alterações da frequência cardíaca (aumento da frequência em repouso nos ratos com epilepsia) encontradas em nosso trabalho. Seguindo essa linha de investigação, o complexo talâmico desempenha um importante papel nesse contexto. Os núcleos do complexo talâmico estão associados com a geração e generalização das crises epiléticas (SCORZA et al., 2008). Além disso, existem relatos suficientes na literatura associando a influência dessa estrutura sub-cortical sobre o sistema cardiovascular, pois é sabido que 04 dias após lesões bilaterais dos núcleos latero-posteriores do tálamo de ratos são capazes de originar lesões miocárdicas (degeneração miofibrilar) (SCORZA et al., 2008). Nesse sentido, existe grande possibilidade desta estrutura estar relacionada, pelo menos em alguns casos específicos, ao aparecimento do fenômeno de morte súbita e inesperada nas epilepsias. (SCORZA e col, 2008).

5.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca

A baixa variabilidade da frequência cardíaca tem sido frequentemente associada com quadros de morte súbita em pacientes com infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (MALLIANI, 2000). Esta (baixa variabilidade da frequência cardíaca) é considerada uma medida do equilíbrio autonômico, pois se refere as variações ao longo do tempo dos intervalos RR consecutivos, os quais são influenciados preferencialmente por estímulos extrínsecos ao coração. A variabilidade pode ser analisada tanto no domínio do tempo quanto da frequência. No domínio do tempo, medidas como SDNN e RMSSD refletem o estado da modulação da frequência cardíaca pela atividade vagal, pois seus valores estão relacionados às variações do ritmo respiratório. Desta forma, a redução destes valores indica menor modulação

parassimpática, o que é considerado um fator de risco para arritmias (MALLIANI 2000). Por outro lado, evidências experimentais sugerem um aumento na atividade do sistema nervoso simpático durante as crises epiléticas (BENOWITZ et al., 1986). De forma similar, trabalhos clínicos posteriores também apontam um aumento da atividade simpática cardiovascular em pacientes com epilepsia, tanto no período ictal quanto interictal (DEVINSKY et. al., 1994; FAUSTMAN e GANZ, 1994). De forma interessante, um estudo relativamente recente desenvolvido por Ansakorpi et. al. (2004) demonstrou que pacientes com epilepsia do lobo temporal, com e sem a presença de esclerose mesial temporal, apresentam alterações da variabilidade da frequência cardíaca e das respostas de reflexos cardiovasculares, sugerindo que as estruturas do lobo temporal desempenham um papel importante na regulação de parâmetros cardíacos. No mesmo contexto, um estudo posterior realizado com jovens recrutas do exército turco mostrou que indivíduos que tinham a epilepsia apresentavam maior atividade simpática quando comparada à daqueles sem epilepsia, de acordo com análises no domínio da frequência da modulação autonômica. O fato de serem sujeitos da mesma idade e gênero é muito importante, uma vez que a modulação autonômica pode sofrer alterações com diferentes domínios (EVRENGÜL et al., 2005). Isto pode ter sido um dos fatores ocorridos no trabalho de Persson et al. (2007), demonstrando que indivíduos com epilepsia recém-diagnosticada não apresentavam diferenças na variabilidade de frequência cardíaca em relação ao grupo controle. No entanto, devemos registrar que nesse trabalho foram avaliados sujeitos de diferentes idades e gênero. Com relação ao nosso trabalho, não houve diferença do grupo crônico quando comparado ao grupo controle com relação às medidas de SDNN e de RMSSD. Isto sugere que a atividade modulatória vagal está preservada nos ratos com epilepsia, pois as medidas refletem de forma confiável as modulações de curto prazo. Finalmente, quando analisadas em valores absolutos, a potência total, a componente de baixa frequência e a componente de alta frequência, não se verificou diferenças em relação ao grupo controle. Isso se deva, talvez, ao fato destes valores variarem muito de indivíduo para indivíduo ou até mesmo, no mesmo indivíduo quando as medidas forem efetuadas em tempos diferentes. Desta forma, se fazem necessárias análises das componentes de alta e baixa frequência a partir de valores normalizados em relação à variância total do sinal (potência total). Feito isso, encontramos diferenças entre o grupo crônico e o grupo controle. Os animais pertencentes ao grupo crônico apresentaram maiores valores de baixa frequência normalizados e maiores valores da razão Lf/Hf quando comparados ao grupo controle. Estes achados sugerem que a atividade simpática está mais intensa nos ratos com epilepsia, indicando um desequilíbrio entre a atividade simpática e parassimpática. No geral, a avaliação

da possível alteração do equilíbrio entre parassimpático e simpático deve ser verificada com bastante critério, pois essa condição pode ser um importante preditor para o aparecimento de graves arritmias nos pacientes com epilepsia.

Alguns trabalhos indicam que, mesmo antes das crises epiléticas, é possível encontrar diferenças da frequência cardíaca (ZIJMANS et al., 2002). Desta forma, analisamos a variabilidade da frequência cardíaca trinta minutos antes e trinta minutos após as crises epiléticas dos nossos animais. Como encontramos valores de frequência cardíaca mais altos após as crises epiléticas, isto nos sugeriu a existência de uma possível alteração da modulação autonômica entre os momentos que precedem as crises epiléticas em relação aos momentos posteriores das mesmas. Nossos resultados demonstraram que no domínio do tempo não houve diferenças de SDNN e RMSSD entre os períodos que antecederam as crises em relação àqueles após o evento ictal. No domínio da frequência também nenhum parâmetro foi diferente quando comparados os minutos antes com os minutos após as crises epiléticas, exceto com a razão Lf/Hf, que se apresentou menor no período após as crises quando analisada num período de trinta minutos. Esse fato sugere que após o período ictal o balanço entre simpático e parassimpático desloca-se para o parassimpático, embora a frequência cardíaca seja maior. Talvez isto esteja relacionado (como a frequência cardíaca) aos eventos que ocorrem durante uma crise epilética. A intensa bradicardia presente no início das crises nos leva a crer que esta seja resultado de uma descarga vagal exacerbada. Esta hipótese está embasada em experimentos realizados por Goodman et al. (1999) que demonstraram no modelo do abrasamento elétrico da amígdala que a bradicardia é bloqueada pela administração de metilnitrato de atropina, um antagonista colinérgico.

5.3 Análise Hhistroquímica

A morfologia do tecido cardíaco é outro aspecto importante a ser analisado. Por outro lado, a inclusão de uma anormalidade cardíaca como causa de morte súbita entre pacientes com epilepsia não é muito simples, pois a existência de cardiopatia hipertrófica, miocardite, anormalidades do sistema de condução elétrica e outros substratos patológicos só podem ser detectados através de exames histológicos específicos e que não são realizados rotineiramente em exames de necropsia (COHLE et. al., 2002; CONRADO et. al., 2001). Assim, vários trabalhos que verificaram alterações do sistema cardiovascular em pacientes com epilepsia e que morreram subitamente, não indicam com precisão os métodos utilizados (THOM et. al.,

2003; KLOSTER e ENGELSKJON, 1999; LEESTMA et. al., 1989, 1997; NILSSON et. al., 1999; SALMO e CONNOLLY, 2002). Além disso, para que uma necropsia mais detalhada seja realizada, o estado de decomposição do tecido é de fundamental importância, no entanto, em vários estudos histológicos, fatores como tempo entre a morte e a análise não são mencionados (THOM et. al., 2003; KLOSTER e ENGELSKJON, 1999; LEESTMA et. al., 1989, 1997; NILSSON et. al., 1999; SALMO e CONNOLLY, 2002; SHIELDS et. al., 2002). Do ponto de vista morfológico, Painter e colaboradores (1993) mostraram a existência de hipertrofia cardíaca em 8 de 10 pacientes com epilepsia que morreram após um episódio de *status epilepticus*. Paralelamente, a ocorrência de outras alterações também foi demonstrada por outros autores, como fibrose das artérias coronárias, fibrose do miocárdio, atrofia dos miócitos, degeneração miofibrilar, fibrose subendocardial, infiltração de leucócitos, edema de tecido condutor e anormalidades morfológicas do sistema de condução (KLOSTER & ENGELSKJON, 1999; NATELSON et. al., 1998; FALCONER & RAJS, 1976; OPESKIN et. al., 2000).

Seguindo essa linha de pensamento, estudos experimentais mostraram a ocorrência de hipertrofia cardíaca 8 a 12 dias após a indução de *status epilepticus* em ratos, mediante injeção de lítio/pilocarpina. Neste estudo os autores sugerem que o tempo em que os animais permaneciam em *status epilepticus* não era um fator determinante no aumento da hipertrofia (WALTON et. al., 1993). Além disso, o aumento dos níveis plasmáticos de troponina pode ser um importante marcador de lesão do tecido cardíaco (GIBBONS et al., 2004). Neste sentido Woodruff et. al. (2003) não encontraram alterações nos níveis plasmáticos de troponina I em pacientes com epilepsia, momentos após as crises, sugerindo dessa maneira, a ausência de lesão miocárdica nesses indivíduos. No entanto, como esses pacientes apresentaram uma elevação da frequência cardíaca no momento da crise, os autores sugerem que a possível causa primária de morte súbita nos pacientes com epilepsia deva estar relacionada com a presença de um evento arritmogênico. Ainda nessa linha de investigação, nosso grupo de pesquisa também dosou a concentração de troponina I em pacientes submetidos à cirurgia de cortico-amígdala-hipocampectomia e que permaneciam refratários após o tratamento cirúrgico. As coletas do plasma sanguíneo foram realizadas durante os períodos interictais e os resultados encontrados não apontaram valores elevados desta proteína. Além disso, mesmo dentro da faixa de normalidade, não houve relação entre as concentrações de troponina e a frequência de crises epiléticas dos indivíduos avaliados (COLUGNATI, 2007). No presente trabalho, nossos resultados mostram que os ratos do grupo crônico apresentam alterações anátomo-patológicas

cardíacas muito mais freqüentes e em maior intensidade quando comparados aos animais dos outros grupos. O exame histoquímico mostrou alterações morfológicas (em todos os casos do grupo crônico) tais como: imagens de necrose com reações macrofágicas e discreta proliferação mitocondrial intrassarcoplasmática e subsarcolemal. Tal padrão histológico pode ser observado em diversas entidades nosológicas neuromusculares (miopatias inflamatórias, vasculites e doenças metabólicas). Neste contexto, também acreditamos que as alterações são mais sugestivas de serem secundárias a processos isquêmicos (LIBBY, 2007). Em vários estudos, o desnivelamento do segmento ST aparece com freqüência nos períodos ictais, sendo uma alteração eletrocardiográfica bastante característica de processos isquêmicos do tecido cardíaco (BYBEE et al., 2004). Em nosso estudo, devido a intensa movimentação do rato durante as crises epiléticas, não foi possível avaliar com precisão se havia ou não episódios com desnivelamento do segmento ST. No entanto, podemos sugerir que o coração sofra micro-isquemias ao longo das crises epiléticas devido à intensa bradicardia que as acompanha. Este quadro pode ser ainda mais grave se considerarmos a provável ocorrência de apnéa central/e ou obstrutiva, o que submeteria o tecido cardíaco a uma condição ainda mais baixa de oferta de oxigênio na medida em que a pressão de O₂ estaria diminuída. Seguindo essa linha de raciocínio, o fato dos animais com epilepsia apresentarem atividade simpática maior durante os períodos interictais e também maior freqüência cardíaca, sugere que o coração dos quando mesmos opere num ritmo maior comparado aos animais dos demais grupos. Dessa maneira, este fato associado aos eventos isquêmicos durante as crises epiléticas poderiam explicar a proliferação mitocondrial. Porém, mais uma vez devemos realizar análises mais específicas (citadas anteriormente) para confirmar tais hipóteses. Nos ratos do grupo agudo, a alteração mais freqüente foi a dilatação vascular. Isto se deve, provavelmente, ao fato do coração ficar exposto a uma carga de trabalho muito intensa durante o *status epilepticus*, aja visto a altíssima freqüência cardíaca detectada nesses animais no presente estudo. No grupo silencioso, apenas em um caso encontramos necrose com proliferação mitocondrial. Nos demais, apenas detectamos 20% de centralizações nucleares sem necrose propriamente dita. Estes dados são importantes a medida que mostram que a despeito do modelo da pilocarpina consistir de uma fase em que o animal permanece em *status epilepticus* durante um tempo bastante considerável e de também se fazer uso de drogas que podem ter ação direta sobre o tecido cardíaco, tal modelo pode ser utilizado para o estudo da influência da epilepsia crônica sobre o sistema cardiovascular, uma vez que os corações dos ratos do grupo silencioso não apresentam mais alterações do que àquelas apresentadas pelo grupo controle. Já no grupo controle, a análise histoquímica mostrou em apenas um caso a presença de necrose com

proliferação mitocondrial, porém, em uma intensidade muito menor da observada nos ratos crônicos.

Como citado previamente, as lesões cardíacas (fibrose das artérias coronárias, fibrose do miocárdio, atrofia dos cardiomiócitos, degeneração miofibrilar, fibrose subendocardial, infiltração de leucocitárias, edema de tecido condutor e anormalidades morfológicas do sistema de condução) encontradas em estudos prévios ao nosso trabalho (KLOSTER & ENGELSKJON, 1999; NATELSON et. al., 1998; FALCONER & RAJS, 1976; OPESKIN et. al., 2000) não são apontadas pelos pesquisadores como a provável causa da morte nos indivíduos com epilepsia, principalmente por tais lesões estarem dentro dos padrões da normalidade. Provavelmente, um indivíduo com desequilíbrio autonômico evidente (como nas pessoas com epilepsia), a intensa estimulação que o coração está submetido durante as crises epilépticas deve contribuir de maneira significativa para a ocorrência de eventos capazes de produzirem alterações da função cardíaca responsáveis pela ocorrência da morte súbita. Finalmente, devemos lembrar também que o tecido cardíaco em remodelamento e até mesmo com a presença tecido cicatricial, pode favorecer ao aparecimento de focos com vulnerabilidade de gerar crises, uma vez que tal processo de reorganização é capaz de levar a formação de vias de condução lenta e de repolarização rápida, facilitando substancialmente a ocorrência de arritmias pelo mecanismo de reentrada. Isto tudo associado há uma condição na qual a atividade simpática esteja alterada, contribuindo ainda mais para o surgimento de eventos arritmogênicos (LIBBY, 2007).

Em conjunto, os resultados encontrados neste trabalho mostram que os animais com epilepsia apresentam alterações da modulação autonômica do coração semelhantes àquelas descritas nos seres humanos e que estão diretamente relacionadas com o aparecimento de morte súbita cardíaca. Em linhas gerais, podemos considerar nosso modelo de epilepsia uma importante ferramenta de estudo para o fenômeno de morte súbita e inesperada nas epilepsias. Além disso, verificamos que os eventos ictais colocam o coração numa situação de estresse intenso capaz de levar a lesões, as quais podem contribuir para o maior risco de morte, principalmente, frente a um quadro de desequilíbrio autonômico.

Desta forma, embora nosso trabalho tenha sido capaz de sanar algumas dúvidas da relação existente entre sistema cardiovascular/epilepsia/morte súbita, diversas perguntas ainda precisam ser desvendadas:

- Por que a modulação autonômica está alterada?
- Esta modulação autonômica alterada está relacionada às lesões presentes no sistema límbico ou em estruturas mais superiores ou há alguma alteração nos centros de controle cardiovascular presentes no tronco cerebral?
- Existe algum tipo de reorganização nervosa do tecido cardíaco do rato com epilepsia?
- Quais mecanismos estão envolvidos na bradicardia ictal?
- Como está o mecanismo de acoplamento excitação-contração do músculo cardíaco dos animais com epilepsia crônica?

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitiram concluir que:

1) Os animais com epilepsia apresentam alterações da modulação autonômica do coração semelhantes às descritas nos seres humanos e que estão diretamente relacionadas com o aparecimento de morte súbita cardíaca.

2) O modelo de epilepsia do lobo temporal induzido pela pilocarpina pode ser considerado uma ferramenta viável para o estudo da relação existente entre sistema cardiovascular/epilepsia/morte súbita.

3) Os animais com epilepsia apresentam alterações morfológicas típicas de lesão por hipóxia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRIGTH, P.S.; BURNHAM, W.M.; OKUXAKI, M. Effect of atropine sulfate on amygdaloid kindling in the rat. **Exp Neurol**, v. 66, p. 409-412, 1979.

Arida, R.M.; Scorza, F.A.; Peres, C.A.; Cavalheiro, E.A. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res**, v.34, 99-107, 1999.

ANDRADE-VALENÇA, L.P.A.; VALENÇA, M.M.; VELASCO, T.R.; LEITE, J.P. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. **J Epilepsy Clin Neurophysiol** v. 2 n.1, 31 –36, 2006.

ANNEGERS, J. F., COAN,S.P., SUDEP: overview of definitions and review of incidence data. **Seizure**, v.8, 347-52, 1999.

ANNEGERS, J. F., HAUSER, W. A., SHIRTS, S. B. Heart disease mortality and morbidity in patients with epilepsy. **Epilepsia**, v.25: 699-704, 1984.

ANSAKORPI, H.,KORPELAINEN, JT., TANSKANEN, P., HUIKURI, H.V., KOIVULA, A., TOLONEN, U., PYHTINEN, J., MYLLYLA, V.V., ISOJARVI, J.I. Cardiovascular regulation and hippocampal sclerosis. **Epilepsia**, v.45, n.8, 933-939, 2004.

ARIDA, R.M., SCORZA, F.A., PERES, C.A., CAVALHEIRO, E.A. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res**, v.34, n.2-3, 99-107, 1999.

BABB, T.L. & BROWN, W.J. Pathological findings in epilepsy. In: Surgical treatment of **epilepsies**. Ed. Engel, Jr. J. pp. 511-540, 1987.

BELLISSIMO, M.I., et al. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Research**, v.46, 121 – 128, 2001.

BENOWITZ, N. L. & SIMON, R. P. Status Epilepticus: Divergence of Sympathetic Activity and Cardiovascular Response. **Ann Neurol**, v.19, 197-199, 1986.

BLUMHARDT, L.D.; SMITH, P.E.M.;OWEN, L. Electrocardiographic accompaniments of temporal lobe epileptic seizures. **Lancet**, 1052-1055, 1986.

BRENNER, C. & MERRIT, H.H. Effect of certain choline derivatives on electrical activity of the cortex. **Arch Neurol Psychiatr**, v.48, p.382-395, 1942.

BRUCE, M.; GRIFFITHS, C.; BROCK, A.; MAJEED, A. Trends in mortality and hospital admissions associated with epilepsy in England and Wales during the 1990s. **World Health Stat Q**, v.21, p.23-29, 2004.

BYBEE, K.A.; KARA, T.; PRASAD, A.; et al. Systematic review: Transient left ventricular apical ballooning: A syndrome that mimics ST-segment elevation myocardial infarction.

Ann Intern Med, v.141, p. 858, 2004.

CAVALHEIRO, E.A.; SANTOS, N.F.; PRIEL, M.R. The Pilocarpine of Epilepsy in Mice. **Epilepsia**, v.37, n.10, 1015-1019, 1996.

CAVALHERIO, E.A.; FERNANDES, M.J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, v.35, n.1, 1–11.

CAVALHEIRO, E.A.; LEITE, J.P.; BORTOLOTTI, Z.A.; TURSKI, W.A.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Long-term effects of pilocarpine in rats: Structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v.32, n.6, 778-782, 1991.

CAVALHEIRO, E.A.; BORTOLOTTI, Z.A.; CALDERAZZO FILHO, L.S. 2-Amino-7-Phosphonoheptanoate retards the development of amygdala kindling in rats. In: Cavalheiro, E.A.; Lehmann, J. & Turski, L., ed. - Frontiers in excitatory amino acid research. **Neurology and Neurobiology**, v. 46, Alan R. Liss, New York, p.243-249, 1988.

CAVALHEIRO, E.A.; & CAMARGO-LIMA, J. G. S. Neurotransmissores e epilepsia. **Revista Brasileira de Neurologia**, v.20, n.2, 51-55, 1984.

CAVALHEIRO, E.A.; CZUCCZWAR, S.J.; KLEINOK, A.; TURSKI, L.; TURSKI, W.A. Intracerebral cholinomimetics produce seizure-related brain damage in rats. **Brit J Pharmacol**, v.79, p.284, 1983.

CENDES, F.; & KOBAYASHI, E. Epilepsia do lobo temporal. **Epilepsia**, 2 ed. São Paulo: Lemos Editorial, p. 201 – 13, 2000.

Chang, B.S.; & Lowenstein, D.H. Epilepsy. **N Engl J Med**, v.349, p.1257-1266, 2003.

CHEN, P. S.; CHEN, L. S.; CAO, J. M.; SHRIFI, B.; KARAGUEUZIAN, H. S.; FISHBEIN, M. C. Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling and the mechanisms of sudden cardiac death. **Cardiovascular Research**, v.50 p. 409-416, 2001.

CLIFFORD, D.B.; OLNEY, J.W.; MANIOTIS, A.; COLLINS, R.C.; ZORUMSKI, C.F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, v.23, 952-968, 1987.

COHEN, R. L.; MORLEY, B.J.; SNEAD, O.C. An EEG analysis of convulsive activity produced by cholinergic agents. **Progr Neuro-Psychopharmacol**, v.5, 383-388, 1981.

COHLE, S.D.; SUAREZ-MIER, M.P.; AGUILERA, B. Sudden death resulting from lesions of the cardiac conduction system. **Am J Forensic Med Pathol**, v.23, n.1, 83-89, 2002.

COLUGNATI D.B.; GOMES, P.A.; ARIDA, R.M.; DE ALBUQUERQUE, M.; CYSNEIROS, R.M.; CAVALHEIRO, E.A.; SCORZA, F.A. Analysis of cardiac parameters in animals with epilepsy: possible cause of sudden death? **Arq Neuropsiquiatr**, v.63, 1035-1041, 2005.

COMMISSION on Classification and terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**, v.30, 389-399, 1989.

COMMISSION on Classification and Terminology of The International League Against Epilepsy Proposal for Revised Clinical and Eletroencephalgraphic Classification of Epileptic Seizures. **Epilepsia**, v.22, 489-501, 1981.

CORCORAN, M. E. Studies of some neuchemicals and kindling. In: **Kindling 3**. Wada, ed. Raven press, New York, p.333-347, 1986.

CORRADO, D.; BASSO, C.; THIENE, G. Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart. **Cardiovasc Res**, v.50, n.2, 399-408, 2001.

DASHEIFF, R. M.; & DICKINSON, R. N. Sudden Unexpected Death of Epileptic Patient due to Cardiac Arrhythmia After Seizure. **Arch Neurol**, v.43, p.194-196, 1986.

DAVIS, W.M.; & HATOUM, N.S. Synergism of the toxicity of phisostigmine and neostigmine by lithium or by a reserpine-like agent (Ro4-1284). **Toxicology**, v.17, p. 1-7, 1980.

de Boer, H.M.; Mula, M.; Sander, J.W. The global burden and stigma of epilepsy. **Epilepsy Behav**, v.12, 540-546, 2008.

DEVINKSY, O. D.; PACIA, S.; TATAMBHOTLA, G. Bradycardia and Asystole Induced by Partial Seizures: A case report and literature review. **Neurology**, v.48, 1712-1714, 1997.

DEVINKSY, O.D.; PERRINI, K.; THEODORE W.H. Interictal autonomic nervous system functions in patients with epilepsy. **Epilepsia**, v.35, p.199-204, 1994.

DEVINKSY, O.; PRINCE, B.H.; COHEN, S.I. Cardiac manifestations of complex partial seizures. **Am J Med**, 80: 195-202, 1986.

DHINGRA, R.; HO, N. B.; BENJAMIN, E.J.; et al: Cross-sectional relations of electrocardiographic QRS duration to left ventricular dimensions: The Framingham Heart Study. **J Am Coll Cardiol**, v. 45, p.685, 2005.

DODRILL, C. B.; WILKUS, R. F.; OJEMANN, G. A.; WARD, A.A.; WYLER, A. R.; VAN BELLE, G.; & TAMAS, L. Multidisciplinary prediction of seizure relief from cortical resection surgery. **Ann Neurol**, v.20, p.2, 1986.

DRAKE, M.F.; RAIDER, C.R.; KAY, A. Electrocardiography in epilepsy patients without cardiac symptoms, **Seizure**, v. 2, p.63-65, 1993.

Duncan, J.S.; Sander, J.W.; Sisodiya, S.M.; Walker, M.C. Adult epilepsy. **Lancet**, v. 367, p.1087-1100, 2006.

EARNEST, P.E.; THOMAS, G.E.; EDEN, R.A.; HOSSACK, K.F. The sudden unexplained death syndrome in epilepsy: demographic, clinical, and postmortem features. **Epilepsia**, v.33, p.310-316, 1992.

ELWES, R.D.S.; JOHNSON, A.L.; SHORVON, A.D.; REYNOLDS, E.H. The prognosis for seizure control in newly diagnosed epilepsy. **N Engl J Med**, v.311 p.944-947, 1984.

ENGEL, JR. J. ILAE Commission Report. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, v.42, n.6, p.796 - 803, 2001.

ENGEL, JR. R. Introduction to temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, v.26, n.1, 141 - 150, 1996.

EPSTEIN, M. A.; SPERLING, M. R.; O'CONNOR, M. J. Cardiac Rhythm During Temporal Lobe Seizures. **Neurology**, v.42, p. 50-53, 1992.

FALCONER, B.; & RAJS, J. Post-Mortem Findings of Cardiac Lesions in Epileptics: A Preliminary Report. **Forensic Science**, v.8, p.63-71, 1976.

FAUSTMANN, P.M.; & GANZ, R.E. Central cardio-autonomic disorganization in interictal states of epilepsy detected by phase space analysis. **Int J Neurosci**, v.78, n.1-2, p.43-47, 1994.

FERNANDES, J.G.; SCHMIDT, M.I.; TOZZI, S., SANDER, J.W.A.S. Prevalence of epilepsy: The Porto Alegre study. **Epilepsia**, v.33, supl. 3, 132, 1992.

Ferreira, I. de L.; Tabosa e Silva, T.P. Mortality from epilepsy in Brazil, 1980-2003. **Cien Saúde Colet**, 14: p.89-94, 2009.

FICKER, D.M.; SO, E.L.; SHEN, W.K.; ANNEGERS, J.F.; O'BRIEN, P.C.; CASCINO, G.D.; BELAU, P.G. Population-based study of the incidence of sudden unexplained death in epilepsy. **Neurology**, v.51, n.5, p.1270-1274, 1998.

FRENCH, J.A.; et al. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: Results of history and physical examination. **Ann. Neurol.** V.34, n.6, 774 – 780, 1993.

FREYTARG, E.; & LINDENBERG, R. 294 medicolegal autopsies in epileptics. **Arch Pathol**, v.78, p.274-286, 1964.

FRYSINGER, R.C.; ENGEL, J.; HARPER, R.M. Interictal heart rate patterns in partial seizure disorders. **Neurology**, v.43, n.10, p. 2136-2139, 1993.

FORSTER, F.M. Action of acetylcholine on motor cortex. Correlation of effects of acetylcholine and epilepsy. **Arch Neurol Psychiatr**, v.54, p. 391-394, 1975.

GORDON, N. Sudden unexpected death in epilepsy. *Developmental Medicine & Child Neurology*, v.43, p.354-357, 2001.

GROSSMAN, S.P. Chemically induced epileptiform seizure in the cat. **Science**, 142: 409-411, 1963.

HAUSER, W. A.; & KURLAND, L. T. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota. **Epilepsia**. v.1, n.1, 1935 – 1968, 1975.

HERZBERG, L. Carbamazepine and bradycardia. **Lancet**, p.1097-1098, 1978.

HILLS, M. J.; DEVINSKY, O.; DOYLE, W.; MAUERER, A.; DÜTSCH, M. Decrease of sympathetic cardiovascular modulation after temporal lobe epilepsy surgery. **Brain**, v.125, p. 985-995, 2002.

HIRSCH, C. S.; & MARTIN, D. L. Unexpected death in young epileptics. **Neurology**, v.21, p. 682-690, 1971.

HOWELL, S. J. L.; & BLUMHARDT, L. D. Cardiac Asystole Associated with epileptic seizures: A case report with simultaneous EEG and ECG. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v.52, p.795-798, 1989.

Hughes, J.R. A review of sudden unexpected death in epilepsy: prediction of patients at risk. **Epilepsy Behav**, v.14, p. 280-287.

JALLON, P.; GOUMAZ, M.; HAENGELLI, C.; MORABIA, A. Incidence of first epileptic seizure in the canton of Geneva, Switzerland. **Epilepsia**, v.38, n. 5, p. 547-552, 1997.

JOPE, R.S.; SIMONATO, M.; LALLY, K. Acetylcholine content in the rat brain is elevated

by status epilepticus induced by lithium and pilocarpine. **J Neurochem**, v.49, p. 944-951, 1987.

KEILSON, M.J.; HAUSER, W.A.; MAGRILL, J.P.; GOLDMAN, M. EcG abnormalities in patients with epilepsy. **Neurology**, v.37, p.1624-1626, 1987.

KIOK, M. C.; TERRENCE, C. F.; FROMM, G. M.; LAVINE, S. Sinus arrest in epilepsy. **Neurology**, v.36, 115-116, 1986.

KISH, S.J.; OLIVIER, A.; DUBEAU, F.; ROBITAILLE, Y.; SHERWIN, A. L. Increased activity of choline acetyltransferase in actively epileptic human cerebral cortex. **Epilepsy Res**, v.2, 227-231, 1988.

KLEINROK, Z.; & TURSKI, L. – Kainic acid-induced wet dog shakes in rats. The relation to central neurotransmitters. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 314: 37-46, 1980.

KLEINROK, Z.; & TURSKI, L. Wet dog shakes in rats produced by kainic acid injection into the lateral brain ventricle. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v.308: r42, 1979.

KLIGFIELD, P.; OKIN, P.M.; LEE K.W.; et al: Significance of QT dispersion. **Am J Cardiol**, v.91:1291, 2003.

KLOSTER, R.; & ENGELSKJON, T. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP): a clinical perspective and a search for risk factors. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.67, n.4, 439-444, 1999.

KLOSTER, R.; BORRESEN, H.C.; HOFF-OLSEN, P. Sudden death in two patients with epilepsy and the SIADH. **Seizure**, v.7, 419-420, 1998.

KOCHEN, S. Cost of antiepileptic drugs. **Lancet**, v.347, p. 266, 1996.

LATHERS, C.M.; & SCHRAEDER, P.L. Autonomic dysfunction in epilepsy: characterization of autonomic cardiac neural discharge associated with pentylenetetrazol-induced epileptogenic activity. **Epilepsia**, v.23, p. 633-647, 1982.

LEESTMA, J.E.; ANNEGERS, J.F.; BRODIE, M.J.; BROWN, S.; SCHRAEDER, P.; SISCOVICK, D.; WANNAMAKER, B.B.; TENNIS, P.S.; CIERPIAL, M.A.; EARL, N.L. Sudden unexplained death in epilepsy: observations from a large clinical development program. **Epilepsia**, v.38, n.1, p. 47-55, 1997.

LEESTMA, J.E., WALCZAK, T., HUGHES, J.R., KALELKAR, M.B., TEAS, S.S., A prospective study on sudden unexpected death in epilepsy. *Ann Neurol* 26(2), 195-203, 1989.

LEESTMA, J. E.; KALELKAR, M. B.; TEAS, S. S.; JAY, G. W.; HUGHES, J. R. Sudden Unexpected Death Associated with Seizures: Analysis of 66 cases. **Epilepsia**, v.25, n.1, 84-88, 1984.

LEITE, J.P.; & CAVALEIRO, E.A. Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. **Epilepsy Research**, v.20, p. 93-104, 1995.

LEITE, J.P.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A. Spontaneous recurrent Seizures in Rats: Na Experimental Model of Partial Epilepsy. **Neuroscience & Behavioral Reviews**, v.14, p. 511-517, 1990.

LEMOS, T.; & CAVALHEIRO, E.A. Status epilepticus and the late develop[ment] of spontaneous seizures in the pilocarpine model of epilepsy – Progressive Nature of Epileptogenesis. **Epilepsy Research**, Suppl. 12, p. 127-143, 1994.

LI, S.C.; SCHOENBERG, B.S.; WANG, C.C.; CHEN, X.M.; ZHOU, S.S. & BOLIS, C.L. Epidemiology of epilepsy in urban areas of the People's Republic of China. **Epilepsia**, v. 26, p. 391-394, 1985.

LIBBY, P., et. al. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 8th ed., Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007.

LIEDHOLM, L. J. & GUDJONSSON, O. Cardiac Arrest Due to Partial Epileptic Seizures. **Neurology**, v.42, p.824-829, 1992.

LUNDY, P. M. & SHAW, R. K. Modification of cholinergically induced convulsive activity and cyclic GMP levels in the CNS. **Neuropharmac**, v.22, p.55-63, 1983.

MARSHALL, D. W.; WESTMORELAND, B. F.; SHARBROUGH, F. W. Ictal Tachycardia During Temporal Lobe Seizures. **Mayo Clin Proc**, v.58, p. 443-446, 1983.

MATTSON, R.H.; CRAMER, J.A.; COLLIS, J.F.; SMITH, D.B.; DELGADO-ESCUETA, A.V.; BROWN, T.R.; WILIAMSON, P.D.; TRIMAN, D.M.; McNAMARA, J.O.; McCUTCHEN, C.B.; HOMAN, R.W.; CRILL, W.E.; LUBOZYNSKI, M.F.; ROSENTAL, N.P. AND MAYERSDORF, A. Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone in partial and secondarily tonic-clonic seizures. **N Engl J Med**, v. 313, p.145-151, 1985.

MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, v.14, p. 3413-3425, 1994.

MELDRUM, B.S. Pharmacological approaches to the treatments of epilepsy. In: **New Anticonvulsant drugs. Currents problems in epilepsy**. B.S. Meldrum and R.J. Porter, eds. John Libbey, London, 4, p. 17-30, 1986.

MELLO, L.E.A.; CAVALHEIRO, E.A.; BABB, T.L.; KUPFER, W.R. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy. Cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia**, v. 34, p. 985-995, 1993.

MILLER, F.R.; STAVRAKY, G.W.; WOONTON, G.A. Effects of eserine, acetylcholine and atropine on the electrocorticogram. **The Journal of Neurophysiology**, v.3, 131-138, 1968.

MUNSON, J.F. Death in epilepsy. **Med Rec**, v.77, p.58-62, 1910.

NADI, N.S.; PORTER, R.J.; WYLER, A.R. Choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase, and tyrosine hydroxylase in the human epileptic focus. **Neurology**, v. 37, p. S106, 1987.

NASHEF, L. Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions. **Epilepsia**, v.38, suppl s6-s8, 1997.

NASHEF, L.; FISH, D.R.; GARNER, S.; SANDER, J.W.A.S.; SHORVON, S.D. Sudden death in epilepsy: a study of a incidence in a young cohort with epilepsy and learning difficulty. **Epilepsia**, v.36, p. 1187-1194, 1995.

NATELSON, B.H.; SUAREZ, R.V.; TERRENCE, C.F.; TURIZO, R. Patients with epilepsy who die suddenly have cardiac disease. **Arch Neurol**, v.55, n.6, 857-860, 1998.

NATELSON, B.H. & CHANG, Q. Sudden death: a neurocardiologic phenomenon. **Neurol Clin**, v.11, p.293-308, 1993.

NATELSON, B.H. Neuro-cardiology: an interdisciplinary area for the eighties. **Arch Neurol**, v. 42, p.178-184, 1985.

NEI, M.; HO, R.T.; ABOU-KHALIL, B.W.; DRISLANE, F.W.; LIPORACE, J.; ROMEO,

A.; SPERLING, M.R. EEG and ECG in sudden unexplained death in epilepsy. **Epilepsia**, v.45, n.4, p.338-345, 2004.

NILSSON, L.; FARAHMAND, B.Y.; PERSSON, P.G.; THIBLIN, I.; TOMSON, T. Risk factors for sudden unexpected death in epilepsy: a case-control study. **Lancet**, v.353, p. 888-893, 1999.

OLNEY, J.W.; COLLINS, R.C.; SLOVITER, R.S. Excitotoxic mechanism of epileptic brain damage. **Advances in Neurology**, v. 44, p. 857-977, 1986.

OLNEY, J.W.; DE GUBAREFF, T.; LABRUYERE, J. Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents. **Nature**. 301:520-522, 1983.

OPHERK, C.; COROMILAS, J.; LAWRENCE, J.H. Heart rate and EKG changes I 102 seizures: analysis of influencing factors. **Epilepsy Research**, v.52, p. 117-127, 2002.

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

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD – Aplicación de los progresos de las neurociencias en la lucha contra los trastornos neurológicos: Informe de un grupo de estudio de la OMS. **Serie de Informes Tecnicos**, 629, 1978.

OSUNTOKUN, B.O.; ADEUJA, A. O. G.; NOTTIDGE, V.A.; SCHOENBERG, B.S. Prevalence of the epilepsies in nigerian africans: A community-based study. **Epilepsia**, v.28, n.3, p. 272-279, 1987.

PAGE, C.P.; CURTIS, M.J.; SUTTER, M.C.; WALKER, M.J.A.; HOFFMAN, B.B. As Drogas e o Sistema Nervoso – In: **Farmacologia Integrada**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p. 93-151. 1999.

PAGLIOLI-NETO, E.; CENDES, F. Tratamento cirúrgico. In: GUERREIRO, C.A., et al. **Epilepsia**. São Paulo: Lemos Editorial, p. 379 – 93, 2000.

PAINTER, J.A.; SHIEL, F.O.; DELORENZO, R.J. Cardiac pathology findings in status epilepticus. **Epilepsia** 34 (suppl. 6), 30, 1993.

PEDLEY, T.A.; SCHEUER, M.L.; WALCZAK, T.S. Epilepsia – In: **Merritt Tratado de Neurologia** – 9. ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1997. **falta pág**

POPE, A.; MORRIS, A.A.; JASPER, H.; ELLIOT, K.A.C.; PENFIELD, W. Histochemical

and action potential studies in epileptogenic areas of cerebral cortex in man and the monkey. **Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.**, v.26, p. 218-231, 1947.

PURPURA, D.P.; PENRY, J.K.; TOWER, D.; WOODBURY, D.L.; WALTER, R. **Experimental Models of Epilepsy: A Manual for Laboratory Worker**. New York: Raven Press, 1972.

RINTAHAKA, P.J.; NAKAGAWA, J.A.; SHEWMON, D.A.; KYIRONEN, P; SHIELDS, W.D. Incidence of death in patients with intractable epilepsy during nitrazepam treatment. **Epilepsia**; v.40, n.4, p. 492-496, 1999.

ROBINSON, R. Cost benefit analysis. **BMJ**, v. 307, n.6909, p. 924-926, 1993.

RODIN, E. A. **The Prognosis of Patients With Epilepsy**. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas, 1968.

SALMO, E.N.; CONNOLLY, C.E. Mortality in epilepsy in the west of Ireland: a 10-year review. **Ir J Med Sci**, v.171, n.4, p.199-201, 2002.

SAMPLES, J.R.; JONOWSKI, D.S.; PECHNICK, R.; JUDD, L.L. Lethal effects of phisostigmine plus lithium in rats. **Psychopharmacology**, v.52, n.3, p. 307-309, 1977.

SAMSON, F.; PAZDERNICK, T.L.; CROSS, R.S.; CHURCHILL, L.; GIESLER, M.P.; NELSON, S.R. Brain regional activity and damage associated with organosphosphate induced seizures: Effects of atropine and banactyzine. **Proc. West. Pharmacol. Soc.**, v.28, p.183-185, 1985.

SANDER, J.W.A.S.; SHORVON, S.D. Incidence and prevalence studies in epilepsy and their methodological problems: A review. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.**, v.50, p.839-839, 1985.

SANDER, J.W.A.S. Etiology and Risk Factors. In: World Health Organization Editor. **Atlas: Epilepsy care in the world**. Geneva: WHO press, p. 26 – 72005.

SANKAR, R., HOLMES, G.L. Mechanisms of action for the commonly used antiepileptic drugs: relevance to antiepileptic drug-associated neurobehavioral adverse effects, **J. Child Neurology**, v.19, Suppl 1, p. S6-S14, 2004.

SO, EL. Demystifying sudden unexplained death in epilepsy--are we close? **Epilepsia**. v.47, suppl 1, p. 87-92, 2006.

- SO, EL. What is known about the mechanisms underlying SUDEP? **Epilepsia**. v.49, suppl. 9, p. 93-98, 2008.
- SCORZA, F.A.; COLUGNATI, D.B.; PANSANI, A.P.; SONODA, E.Y.; ARIDA, R.M.; CAVALHEIRO, E.A. Preventing tomorrow's sudden cardiac death in epilepsy today: what should physicians know about this? **Clinics**. v. 63, n.3, p. 389-394, 2008.
- SCORZA, F.A.; Arida, R.M.; Cavalheiro, E.A. Thalamic pathology in sudden cardiac death in epilepsy: a shed light on mysterious event. **Epilepsy Res**. V.82, n.1, p. 107-108, 2008.
- SCORZA, F.A.; DE ALBUQUERQUE, M.; ARIDA, R.M.; CAVALHEIRO, E.A. Sudden unexpected death in epilepsy: are winter temperatures a new potential risk factor? **Epilepsy Behav**. V. 10, n.3, p. 509-510, 2007.
- SCORZA, F.A.; SANABRIA, E.R.G.; CALDERAZZO, L.; CAVALHEIRO, E.A. Glucose utilization Interictal Intervals in a Epilepsy Model Induced by Pilocarpine: A Qualitative Study. **Epilepsia**. v. 39, n. 10, p.1041-1045, 1998.
- SHIELDS, L.B.; HUNSAKER, D.M.; HUNSAKER, J.C. 3rd; PARKER, J.C.Jr. Sudden unexpected death in epilepsy: neuropathologic findings. **Am J Forensic Med Pathol**. v.23, n.4, p. 307-314, 2002.
- SJÖSTRAND, T. Potential changes in the cerebral cortex of the rabbit arising from cellular activity and the transmission of impulses in the white matter. **The Journal of physiology (Lond.)**, v.90, p. 41P-45P, 1937.
- STÖLLBERGER, C; FINSTERER, J. Cardiorespiratory findings in sudden unexplained/unexpected death in epilepsy(SUDEP). **Epilepsy Res**. v. 59, n. 1, p. 51-60, 2004.
- TAVERNOR, S.J., BROWN, S.W., TAVERNOR, R.M., GIFFORD, C.,. Electrocardiograph QT lengthening associated with epileptiform EEG discharges--a role in sudden unexplained death in epilepsy? **Seizure**. v.5, n.1, p.79-83, 1996.
- TENNIS, P.; COLE, T.B.; ANNEGERS, J.F.; LEESTMA, J.E.; MCNUTT, M.; RAJPUT, A. Cohort study of incidence of sudden unexplained death in persons with seizure disorder treated with antiepileptic drugs in Saskatchewan, Canada. **Epilepsia**, v.36, n.1, p.29-36, 1995.
- TERRENCE, D. F. JR; WISOTSKEY, H. M.; PERPER, J. A. Unexpected, unexplained death in epileptic patients. **Neurology (NY)**. v.25, p.594-598, 1975.
- THOM, M., SEETAH, S., SISODIYA, S., KOEPP, M., SCARAVILLI, F., Sudden and unexpected death in epilepsy (SUDEP): evidence of acute neuronal injury using HSP-70 and c-Jun immunohistochemistry. **Neuropathol Appl Neurobiol**. v.29, n.2, p.132-43, 2003.
- TOMSON, T; NASHEF, L; RYVLIN, P. Sudden unexpected death in epilepsy: current knowledge and future directions. **Lancet Neurol**. v.7, n. 11, p.1021-1031, 2008.

TOMSON, T.; WALCZAK, T.; SILLANPAA, M.; SANDER, J.W. Sudden unexpected death in epilepsy: a review of incidence and risk factors. **Epilepsia**. v.46, Suppl 11, p.54-61, 2005.

TOMSON, T.; ERICSON, M.; IHRMAN, C.; LINDBLAD, L.E. Heart rate variability in patients with epilepsy. **Epilepsy Research**. v.30, n. 1, p.77-83, 1998.

TOWER, D.B.; McEARCHERN, D. Acetylcholine and neuronal activity; acetylcholine and cholinesterase activity in cerebrospinal fluid of patients with epilepsy. **Can. J. Res**, v.27, n.2, p.120-131, 1949.

TRANCHESI, J. Eletrocardiograma normal e patológico: noções de vectorcardiografia. São Paulo: Atheneu, pp 680, 1972.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; COIMBRA, C.; BERZAGHI, M.P.; TURSKI-IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Only certain epileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine. **Brain research Reviews**, v. 434, n. 3, p. 281-305, 1987.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; BORTOLOTTI, Z.A.; MELLO, L.E.; SCHWARZ, M.; TURSKI, L. Seizures produced by pilocarpine in mice: behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res**. v.321, p.237-253, 1984.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav. Brain Res**. v.9, p.315-335, 1983a.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; TURSKI, L.; KLEINROK, Z. Intrahippocampal bethanechol in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. **Behav. Brain Res**. v.7, p.361-370, 1983b.

TURSKI, W.A.; CZUCZWAR, S.J.; TURSKI, L.; KLEINROK, Z. Systemic pilocarpine produces limbic seizures and brain damage in mice. **Neurosci. Lett**. Supp. 14; p. 380s, 1983c.

TURSKI, W.A.; CZUCZWAR, S.J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. **Experimentia**. v.39, n.12, p.1408-1411, 1983d.

TURSKI, L; CZUCZWAR, S.J.; TURSKI, W.A.; KLEINROK, Z. Induction of wet dog shakes by intracerebroventricular bethanechol in rats. Antagonism by neurotransmitter receptor blockers. **Pharmacology**. v.24, p. 105-110, 1982

TURSKI, L; CZUCZWAR, S.J.; TURSKI, W.A.; KLEINROK, Z. Studies of carbachol-induced wet dog shakes behavior in rats. **Psychopharmacology**. v. 73, p. 81-83, 1981.

VAN RIJCKEVORSEL, K.; SAUSSO, F.; DEBARSY, T. Bradycardia, and epileptic ictal manifestation. **Seizure**. v.4, n. 3, p.237-239, 1995.

VENOGOPAL, M.; PERSINGER, M.A. Conditioned taste aversion is reduced in rats with a history of lithium/pilocarpine-induced limbic seizures. **Neuroscience Letters**. v.90, p.177-180, 1988.

VOSU, H.; WISE, R.A. Cholinergic seizure kindling in the rat: comparison of caudate, amygdala and hippocampus. **Behav. Biol.** v.13, p.491-495, 1975.

WALTON, N.Y.; RUBINSTEIN, B.K.; TREIMAN, D.M. Cardiac hypertrophy secondary to status epilepticus in the rat. **Epilepsy Res**. v.20, n.2, p.121-124, 1995.

WESTERBERG, V.; LEWIS, J.; CORCORAN, M.E. Depletion of noradrenaline fails to affect kindled seizures. **Exp. Neurol.** v.84, n.11, p. 237-240, 1984.

WOLF, H.K.; WIESTLER, O.D. Surgical pathology of chronic epileptic seizure disorders. **Brain Pathol.** v.3, p.371-380, 1993.

WOLF, H.K.; MÜLLER, M.B.; SPÄLE, M.; ZENTLER, J.; SCHRAMM, J.; WIESTLER, O.D. Ganglioglioma: a detailed histopathological and immunohistochemical analysis of 61 cases. **Acta Neuropathol.** v.88, p.166-173, 1994.

WOODBURRY, L. A. Shortening of the life span and mortality of patients with of epilepsy. **Plan for nationwide action on epilepsy**. Vol. IV. Publication n° (NIH), v. 78, p. 276, 1978.

WOODRUFF, M.D. et. al.. Cardiac troponin levels following monitored epileptic seizures, **Neurology**. v.60, n.10, p.1690-1692, 2003.

ZIELINSKI, J. J. Epilepsy and mortality rate and cause of death. **Epilepsia**. v.15, p. 191-201, 1974.

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

ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common neurologic problems worldwide. Approximately 3 percent of persons in the general population will have epilepsy at some point in their lives. Unfortunately, individuals with epilepsy are at higher risk of death than the general population and SUDEP is the most important direct epilepsy-related cause of death. SUDEP is responsible for 7.5% to 17% of all deaths in epilepsy and has an incidence among adults between 1:500 and 1:1,000 patient-years. A number of associated factors for SUDEP have been reported but the results are not wholly consistent between studies. These include refractoriness of the epilepsy, presence of generalized tonic-clonic seizures, polytherapy with antiepileptic drugs, young age, duration of the seizure disorder ranging from 15 to 20 years, early onset of epilepsy and winter temperatures. Additionally, potential pathomechanisms for SUDEP are unknown, but it is very probable that cardiac arrhythmia due to myocardial ischemia play a potential role. Based on this factor, we evaluated the cardiac function and morphology of rats during the three evolution periods (acute, silent and chronic) of the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. From functional point of view, we analyzed the electrocardiogram and the autonomic heart modulation. For that, both autonomic modulation and electrocardiogram were verified without, before seizure and during seizure. It is important to note that all analyses were compared to the age-matched control group. During seizure period, our results showed an intense cardiac rhythm alteration due an important influence of parasympathetic nervous system. On the other hand, in the seizure free period, we found a large sympathetic activity in the rats with chronic epilepsy in relation to the control group. From a morphological point of view, we found specific histological features in the rats with epilepsy, such as necrosis and mitochondrial proliferation. On the whole, our results suggest that chronic epilepsy condition lead to alterations on both autonomic modulation and cardiac morphology that may contribute to the higher risk of sudden unexpected death in epilepsy

APÊNDICE

TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO