

JANISE DAL PAI

**VIDEOMONITORAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO (1 ANO) DE FÊMEAS QUE
NÃO DESENVOLVERAM *STATUS EPILEPTICUS* PÓS PILOCARPINA E A
POSSÍVEL OCORRÊNCIA DE CRISES ESPONTÂNEAS TARDIAS**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de Medicina
para obtenção do Título de Doutora em
Ciências**

**São Paulo
2017**

JANISE DAL PAI

**VIDEOMONITORAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO (1 ANO) DE FÊMEAS QUE
NÃO DESENVOLVERAM *STATUS EPILEPTICUS* PÓS PILOCARPINA E A
POSSÍVEL OCORRÊNCIA DE CRISES ESPONTÂNEAS TARDIAS**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de Medicina
para obtenção do Título de Doutora em
Ciências**

Orientadora: Profa Dra. Débora Amado Scerni

São Paulo

2017

Dal Pai, Janise

Videomonitoração de longa duração (1 ano) de fêmeas que não desenvolveram *status epilepticus* pós pilocarpina e a possível ocorrência de crises espontâneas tardias/ Janise Dal Pai – São Paulo, 2017.

XXIV, 122f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Neurologia /Neurociências.

Título em Inglês: Long term videomonitoring (1year) of female rats that did not develop *status epilepticus* after pilocarpine and the possible occurrence of late spontaneous seizures

1. Epilepsia; 2. Fêmeas; 3. *Status Epilepticus*; 4. Videomonitoração;
5. Ovariectomia

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA E NEUROCIRURGIA
DISCIPLINA DE NEUROCIÊNCIAS

Chefe de Departamento:

Prof. Dr. Manoel Antônio de Paiva Neto

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Neurologia/ Neurociências:

Profa. Dra. Célia Harumi Tengan

JANISE DAL PAI

**VIDEOMONITORAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO (1 ANO) DE FÊMEAS QUE
NÃO DESENVOLVERAM *STATUS EPILEPTICUS* PÓS PILOCARPINA E A
POSSÍVEL OCORRÊNCIA DE CRISES ESPONTÂNEAS TARDIAS**

Presidente da Banca

Prof^a. Dr^a. Débora Amado Scerni

Banca Examinadora

Prof^a Dr^a. Margareth Rose Priel

Prof Dr. Fernando Cendes

Prof Dr. Ivaldo Silva

Prof^a.Dr^a. Sandra Perosa

Aprovada em

14/12/2017

Esta tese foi realizada na Disciplina de Neurociências do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, durante o curso de Pós-graduação em Neurologia e Neurociências. Auxílio financeiro: CAPES, CNPq, e Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INNT). Aluna bolsista do CNPq.

Dedicatória

Às mulheres, homens, crianças e idosos com epilepsia. Desejo um dia fazer mais por vocês.

Agradecimentos

Agradeço à Deus pela oportunidade desta vida e à Ele e seus benfeitores por sempre me ouvirem e orientarem.

À minha mãe Lenise Leusin, pelo incentivo desde pequena à leitura e a explorar o novo e o mundo. Ao meu pai, Gastão Dal Pai, pelas inúmeras e incansáveis orientações quanto à busca do conhecimento e crescimento profissional. Agradeço imensamente à vocês, pois foi o cuidado, o carinho, a paciência e a persistência de vocês que orientaram as minhas escolhas e os caminhos que percorri.

À minha avó Zair Rizzo Leusin, por todo amor que somente uma avó sabe transmitir. À minha querida irmã Camila Hohne (Mila), por estar sempre perto mesmo estando longe. À minha prima-irmã Cristine Leusin Cezimbra (Cris) pelas inúmeras conversas, risadas e presença constante. À minha tia Liede Leusin (Tita) pelo carinho e torcida constante por mim. À minha tia Roseli Dal Pai (Tia Lili) por todo amor que me transmite, pela torcida constante, pelo carinho e alegria de sempre!

A Jorge Luiz Paschoal, incansável e alegre companheiro, meu imenso agradecimento por contribuir de inúmeras formas para a conclusão desta tese, pelo amor, carinho, atenção e apoio.

A Alex Kors Vidsiunas, o qual participou de grande parte desta caminhada, meu profundo e sincero agradecimento, carinho e respeito.

Meu imenso agradecimento à Profa Débora Amado pela oportunidade a mim concedida de conhecer e mergulhar no mundo da Epilepsia e pelas inúmeras oportunidades que a partir desta surgiram.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação que me auxiliaram para que esta tese fosse concluída, Rebeca Puccinelli, Gabriela de Melo Predebon, Vassiliki Patsis, Ana Carolina Cossa e Vivian Sanabria.

Aos demais amigos e colegas de Pós-Graduação pela convivência nestes anos, pelo auxílio de inúmeras formas, por compartilhar esta fase, pelas conversas e momentos de descontração, Anna Karynna, Paulo, Vivian, Michelle, Eduardo, Priscila, Joise, Paula, Marjorie, Telma, Manaira, Mariana, Elane, Elisa e José Claudio.

Aos funcionários do Programa, Luis Fernando, Sandra, Simone, Eduardo, Claudio e Márcia.

Agradecimento especial ao funcionário e querido amigo Edvaldo Messias, para mim, uma pessoa exemplar.

Às minhas queridas amigas Rejane Pedrosa (Rê), Maria Solange (Sol) e Simone (Si), pela amizade, risadas, descontração e por torcerem pela conclusão desta fase.

Meu doce agradecimento à três pequenos e amáveis seres que me enchem de amor e de carinho, as gatinhas Amora, Bebezinha e Floquinha.

Homenagem

À minha querida tia Rosali Dal Pai, que nos deixou tão repentinamente.
Que Deus, em seu infinito amor, a receba e ampare.

“Ninguém nasce odiando o outro pela cor de sua pele, por sua origem ou por sua religião. Para odiar, as pessoas precisam aprender, e se podem aprender a odiar, elas podem aprender a amar.”

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

Nelson Mandela

“A ciência é o grande antídoto do veneno do entusiasmo e da superstição.”

Adam Smith

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	VII
AGRADECIMENTOS.....	VIII
HOMENAGEM.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XVI
LISTA DE TABELAS.....	XVIII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XX
RESUMO.....	XXI
ABSTRACT.....	XXIII
I. INTRODUÇÃO.....	25
1. Epilepsia.....	26
1.1 Formação Hipocampal.....	27
1.2 Fatores de Risco e o Desenvolvimento da Epilepsia.....	29
1.3 Fisiopatologia da Epilepsia.....	31
1.3.1 Alterações Morfológicas.....	31
1.3.2 Alterações Neuroquímicas.....	32
1.3.3 Ação dos Hormônios Sexuais Femininos e a Epilepsia.....	34
1.3.3.1 Estrogênios.....	34
1.3.3.2 Progesterona.....	37
2. Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e as Alterações Reprodutivas de Origem Hormonal na Epilepsia.....	38
2.1 Estrogênios e Progesterona e as Alterações do Ciclo Menstrual na Epilepsia.....	40
3. Modelo Experimental de Epilepsia utilizando a Pilocarpina.....	43
3.1 Modelo da Pilo em Fêmeas.....	46

3.2 Controvérsias quanto a ocorrência de crises espontâneas e recorrentes em animais que não apresentaram <i>Status Epilepticus</i> no modelo de epilepsia induzido pela Pilocarpina.....	49
II. JUSTIFICATIVA.....	52
III. OBJETIVOS.....	54
3.1 Objetivo Geral.....	55
3.2 Objetivos Específicos.....	55
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
4.1 Animais.....	57
4.2 Grupos Experimentais e Controle.....	57
4.3 Estudo Colpocitológico.....	58
4.4 Indução ao Modelo Experimental de Epilepsia do Lobo Temporal.....	59
4.5 Ovariectomia.....	60
4.5.1 Cuidados pós-ovariectomia.....	61
4.6 Sistema de videomonitoração.....	62
4.7 Parâmetros analisados.....	63
4.8 Análise Estatística.....	64
V. RESULTADOS.....	65
5.1 Avaliação Comportamental após a indução do modelo de Epilepsia do Lobo Temporal pela Pilo.....	66
5.1.1 Latência para a primeira alteração motora após a injeção de Pilo.....	67
5.1.2 Latência para a ocorrência de SE.....	68
5.2 Mortalidade por crise tônica após a Pilo.....	68
5.3 Mortalidade durante o SE.....	69
5.4 Alterações quanto à regularidade do Ciclo Estral.....	69

5.5 Videomonitoração dos Grupos Experimentais em Períodos de até 12 e 16 meses de observação.....	70
5.5.1 Velocidade de gravação e observação de alterações motoras.....	72
5.5.2 Videomonitoração dos Grupos SSE, SSEOVX e OVXSSE.....	76
5.5.3 Videomonitoração dos Grupos SE, SEOVX e OVXSE.....	81
VI. DISCUSSÃO.....	87
VII. CONCLUSÃO.....	102
VIII. REFERÊNCIAS.....	105
IX. ANEXOS.....	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conexões da formação hipocampal do rato, disposição das células granulares do giro dentado e colaterais de Schaffer. As fibras musgosas partem das células do giro dentado e se projetam para CA3, onde se localizam as células piramidais. http://www.iop.kcl.ac.uk/iopweb/blob/downloads/locator/l_622_Neurogenesis.jpg acessado em 18/02/17.....	29
Figura 2. Patogênese e descrição das características histológicas da ELT. Modificada de Curia et al. (2014).....	31
Figura 3. Níveis de estradiol e progesterona durante um ciclo menstrual normal (figura acima) e durante um ciclo com fase lútea inadequada (abaixo). As fases do ciclo são representadas letras F (folicular), O (ovulatória), L (lútea) e M (menstrual). Os três padrões de epilepsia catamencial são: perimenstrual (C1), periovulatório (C2) e fase lútea inadequada (C3). Retirado de Herzog (2008a).....	42
Figura 4. Representação esquemática do tratamento aplicado aos animais experimentais e controle.....	58
Figura 5. Distribuição de animais e procedimentos. Sem <i>Status Epilepticus</i> (SSE), Sem <i>Status Epilepticus</i> Ovariectomizada (SSEOVX), com <i>Status Epilepticus</i> (SE), com <i>Status Epilepticus</i> Ovariectomizada (SEOVX Ovariectomizada Sem <i>Status Epilepticus</i> (OVXSSE), Ovariectomizada com <i>Status Epilepticus</i> (OVXSE) e controle (CTL).....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

allo-THDOC: alotetrahidrodesoxicorticosterona

AMPA: α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazole-4-propionato

AP: alopregnenolona

CA: Corno de Amon

Ca²⁺: cálcio

CEDEME: Centro de Desenvolvimento em Experimentação Animal

CER: crise espontânea e recorrente

CT: crise tônica

CTC: crise tônico-clônica

CTL: controle

DAEs: drogas anti-epilépticas

DG: diacilglicerol

EEG: eletroencefalograma

EH: Esclerose Hipocampal

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

ELTM: Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

FSH: Hormônio Folículo-estimulante

GABA: ácido γ -aminobutírico

GD: Giro Dentado

GnRH: Hormônio Liberador da Gonadotrofina

GPv: Globo Pálido Ventral

ILAE: International League Against Epilepsy

ip.: intraperitoneal

IP3: inositoltrifosfato

KA: cainato

LH: Hormônio Luteinizante

M1: receptor muscarínico do tipo 1

M2: receptor muscarínico do tipo 2

min.: minuto

mpp: meses pós-pilo

Na⁺: sódio

NB: Núcleos da Base

NC: Núcleo Caudado

NST: Núcleo Subtalâmico

OVXSE: Ovariectomizada e *Status Epilepticus*

OVXSSE: Ovariectomizada e Sem *Status Epilepticus*

rNMDA: receptor N-metil-D-aspartato

Pilo: Pilocarpina

rGABAA: receptor do ácido γ-aminobutírico tipo A

s.: segundo

sc.: subcutânea

SE: *Status Epilepticus*

SEOVX: *Status Epilepticus* Ovariectomizada

SNpr: Substância Negra porção reticular

SSE: Sem *Status Epilepticus*

SSEOVX: Sem *Status Epilepticus* Ovariectomizada

UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito dos hormônios estrogênio e progesterona sobre o tecido nervoso.....	38
Tabela 2. Dados do ciclo estral dos grupos SSE, SE e CTL ao longo de 12 meses após receberem a Pilo ou Salina.	70
Tabela 3. Número de fêmeas dos grupos SSE, SSEOVX, OVXSSE, SE, SEOVX, OVXSE videomonitoradas ao longo de 16 meses.....	71
Tabela 4. Classificação dos 4Ms, quanto aos movimentos ou a ausência destes identificados em fêmeas SSE, SSEOVX, OVXSSE, SE, SEOVX e OVXSE.....	75
Tabela 5. Classificação dos 6Bs quanto aos comportamentos observados nos grupos experimentais (SSE, SSEOVX, OVXSSE, SE, SEOVX e OVXSE).....	76
Tabela 6. Número de fêmeas videomonitoradas e assistidas nas velocidades rápida e real, SSE (1-16 mpp), SSEOVX e OVXSSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo.....	77
Tabela 7. Número de comportamentos do tipo crises (sugestivas e sugestivas 4M) e comportamentos do tipo 4M (único e complexos) nas fêmeas SSE (1-16 mpp), SSEOVX e OVXSSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo.....	78
Tabela 8. Estadiamento e número de comportamentos do tipo crises sugestivas e crises sugestivas 4M nas fêmeas SSE (1-16 mpp), SSEOVX e OVXSSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo.....	79
Tabela 9. Número de comportamentos do tipo 4M único e 4M complexo nas fêmeas SSE (1-16 mpp), SSEOVX e OVXSSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo.....	80

Tabela 10. Número de fêmeas videomonitoradas nas velocidades rápida e real, SE (1-12 mpp), SEOVX (1-4 mpp) e OVXSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo.....	81
Tabela 11. Número e porcentual de crises (e crises 4M) e comportamentos 4M único e complexo nas fêmeas SE (1-12 mpp), SEOVX (1-4mpp) e OVXSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo.....	82
Tabela 12. Número e porcentual de crises estadio 5 e classes 6-7 nas fêmeas SE (1-12 mpp), SEOVX (1-4 mpp) e OVXSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo.....	83
Tabela 13. Número e porcentual de crises e crises 4M identificadas nas fêmeas SE (1-12 mpp), SEOVX (1-4 mpp) e OVXSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo.....	84
Tabela 14. Tempo de imobilidade associado à crises e comportamentos 4M complexo nas fêmeas SE (1-12 mpp), SEOVX (1-4 mpp) e OVXSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo.....	85
Tabela 15. Número e descrição dos comportamentos do tipo 4M único e complexo observados nas fêmeas SE (1-12 mpp), SEOVX (1-4 mpp) e OVXSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo.....	86

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Latência para a primeira alteração motora após a injeção de Pilo, grupo NOVX IC (95%): 4,38-14,52 min. e média e DE ($9,45 \pm 2,27$ min.) e OVX IC (95%): 12,71-19,96 min. e $X \pm DE$ ($16,33 \pm 2,27$ min), U:21 e $p=0,0328$. As barras no gráfico representam a média e desvio do erro, foi aplicado o Teste *Mann-Whitney*. NOVX: não ovariectomizada; OVX: ovariectomizada.....67

Gráfico 2. Latência para o SE após a injeção de 360mg/Kg de Pilo em fêmeas NOVX $X \pm DE$ $23,43 \pm 1,23$ min. e IC (95%) de 20,41-26,44 min e OVX $X \pm DE$ $28 \pm 1,48$ min. e IC (95%) de 24,48-31,52 min., $p=0,0369$. As barras no gráfico representam a $X \pm DE$, foi aplicado o Teste *T Student*. NOVX: não ovariectomizada; OVX: ovariectomizada.68

RESUMO

Introdução: A epilepsia é uma das principais doenças neurológicas existentes, sendo a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) sua forma mais frequente. Afeta no mínimo 20% de todos os pacientes com epilepsia e igualmente cerca de 50 milhões de homens e mulheres em todo o mundo. O uso do modelo experimental de epilepsia por meio da administração do agonista colinérgico Pilocarpina (Pilo), mimetiza grande parte das alterações comportamentais e eletroencefalográficas observadas na ELT. Este modelo aplicado à ratas, permite estudar as alterações do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal ocasionadas pelas crises epiléticas. Estudos em nosso laboratório têm demonstrado que 47% das fêmeas que recebem a Pilo não desenvolvem *status epilepticus* (SE). Navarro et al. (2009) observaram que ratos que não desenvolveram SE (SSE) após receberem a Pilo, apresentaram crises espontâneas e recorrentes (CER) a partir de 6-8 meses do tratamento com a droga. O estudo da ELT, em fêmeas não ovariectomizadas (NOVX) e ovariectomizadas (OVX) submetidas ao modelo da Pilo e que não apresentaram SE, pode trazer importantes informações acerca dos mecanismos envolvidos na geração e na ausência do SE, da fisiopatologia do modelo da Pilo e da neuroproteção hormonal na fisiopatologia da epilepsia. **Objetivos:** Investigar se fêmeas NOVX e OVX antes ou após receberem a Pilo e que não apresentaram SE, desenvolverão CER durante o período de um ano de videomonitoração. **Métodos:** Ratas OVX e NOVX (com ciclo estral regular) receberam 360 mg/kg de Pilo ip. e foram distribuídas em 6 grupos experimentais, SSE, SSEOVX, OVXSSE, SE, SEOVX e OVXSE. As fêmeas foram videomonitoradas por 12 meses para observação da presença de CER. As gravações obtidas foram analisadas na velocidade rápida de reprodução, e, a seguir, na velocidade real (em que os movimentos são realizados) para a identificação de alterações motoras. **Resultados:** As fêmeas dos grupos SE, SEOVX e OVXSE tiveram suas gravações assistidas na velocidade rápida, onde foi observado que todas se tornaram epiléticas. Fêmeas de alguns destes grupos, inclusive, apresentaram estadiamento de crises superior a 5 de Racine (1972) e foram classificadas de acordo com as classes motoras de crises de Pinel e Rovner (1978a e 1978b). Nenhuma alteração motora foi identificada nas fêmeas SSE, SSEOVX e OVXSSE quando as gravações obtidas foram analisadas na velocidade rápida. Entretanto, ao analisar as gravações na velocidade real, foram identificados comportamentos muito similares àqueles descritos como estadios 1-3 de Racine (1972) e assim classificados como sugestivos de crises. Além destes, foram observados comportamentos dos quais parte ainda não estão descritos na literatura para animais injetados com Pilo, entretanto alguns são muito semelhantes às alterações motoras observadas em pacientes com epilepsia. Estes comportamentos foram, da mesma forma, identificados nas fêmeas dos grupos SE, SEOVX e OVXSE. Com base nestes achados é sugerido nesta tese um complemento às classificações de crises existentes, denominada FeBAP, a qual é voltada a fêmeas injetadas com Pilo e que apresentaram ou não SE após serem submetidas ao modelo. **Conclusão:** Assistir a videomonitoração na velocidade real foi essencial para a identificação das alterações motoras nas fêmeas dos grupos SSE, SSEOVX e OVXSSE. A similaridade entre as manifestações observadas, aquelas descritas como estadios 1-3 e com os comportamentos dos grupos SE, SEOVX e OVXSE, sugere que as mesmas se tratam de crises com origem em um possível foco epileptogênico. A videomonitoração foi fundamental para a identificação das

alterações motoras, entretanto, há a necessidade de realizar um estudo eletroencefalográfico para confirmação dos achados deste trabalho.

Palavras-chave: 1. Epilepsia; 2. Fêmeas; 3. *Status Epilepticus*; 4. Videomonitoração; 5. Ovariectomia

ABSTRACT

Introduction: Epilepsy is one of the main neurologic diseases and Temporal Lobe Epilepsy (TLE) is the most frequent form. TLE affects the minimum of 20% of all patient with epilepsy and equally around 50 million of man and woman in the whole world. The use of the experimental model of epilepsy by administering the cholinergic agonist Pilocarpine (Pilo) mimics most of the behavioral and electrographic alterations found in TLE. Female rats submitted to this model allow the study of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis alterations due to epileptic seizures. Studies in our laboratory has shown that 47% of the whole female rats who has received Pilo did not develop *status epilepticus* (SE). Navarro et al. (2009) found that male rats that did not develop SE (NSE) after receiving Pilo showed up spontaneous and recurrent seizures (SRS) starting 6-8 months after treatment with the drug. The study of TLE in ovariectomized (OVX) and non ovariectomized female rats (NOVX) induced to Pilo model that did not develop SE may show up important informations about the mechanisms involved in the generation and in the absence of SE in female rats, also the physiopathology of Pilo experimental model and the hormonal neuroprotection in the physiopathology of epilepsy. **Aims:** To investigate whether NOVX and OVX female rats, before or after receiving Pilo, and did not have SE, will develop SRS in the following one-year videomonitoring period. **Methods:** OVX and NOVX female rats (with regular cycle) received 360 mg/kg of Pilo ip. and were distributed in 6 experimental groups NSE, NSEOVX, OVXNSE, SE, SEOVX and OVXSE. Female rats were videomonitoring for 12 months for the observation of SRS. The video acquired along this period were analyzed in fast speed and after that in real speed (speed in which the movements occur) in search of motor alterations. **Results:** Female rats from SE, SEOVX and OVXSE groups had their recordings watched in the fast speed, which allowed the observation that all of them became epileptic. Some females have even showed seizure upper to stage 5 from Racine (1972) and were classified as class motor seizures by Pinel e Rovner (1978a e 1978b). No motor alterations could be verified in the NSE, NSEOVX and OVXNSE females when recordings were analyzed in the fast speed. However, when the real speed was used, it was possible to identify very similar behaviors described as stages 1-3 from Racine (1972) and were classified as suggested seizures. Besides these, other behaviors not yet described in the literature for animals injected with Pilo were observed, however some of them are very similar to motor alterations seen in epilepsy patients. These behaviors were also identified in SE, SEOVX and OVXSE female groups. Considering the findings of this thesis, it is suggested a complement to be added to the classifications already known for seizures in rats named FeBAP Classification, which may be used in female rats that developed or not SE after being induced to Pilo model. **Conclusion:** Watching the videomonitoring in the real speed was essential for identifying motor alterations in NSE, NSEOVX and OVXNSE female groups. The similarity among observed manifestations, those described as stages 1-3 and behaviors found in SE, SEOVX and OVXSE female groups suggest that those are seizures with origin in a possible epileptogenic focus. Videomonitoring was fundamental for identifying motor alterations however, there is a need of an electroencephalographic study to confirm the findings from this work.

Key-Words: 1. Epilepsy; 2. Female rats; 3. *Status Epilepticus*; 4. Videomonitoring;
5. Ovariectomy

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Epilepsia

A epilepsia foi definida até o ano de 2013 como um distúrbio caracterizado pela predisposição persistente do encéfalo em gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais desta condição (Fisher et al., 2005; Fisher et al., 2014; Fisher, 2015). Por meio de publicação realizada pela International League Against Epilepsy (ILAE), a epilepsia deixou de ser classificada como um distúrbio e passou a ser considerada uma doença do encéfalo definida por uma das seguintes condições:

- Ocorrência de pelo menos duas crises não provocadas (ou crises reflexas) com intervalo superior a 24 horas;
- Ocorrência de uma crise não provocada (ou reflexa) e a probabilidade de ocorrência de novas crises semelhante ao risco de recorrência geral (pelo menos 60%) depois de duas crises não provocadas e no curso de 10 anos, ou;
- Diagnóstico de uma síndrome epilética (Fisher et al., 2014; Fisher, 2015).

As crises epiléticas são definidas como a presença transitória de sinais e/ou sintomas devido a uma atividade excessiva (anormal) ou neuronal síncrona do encéfalo (Fisher et al., 2005; Reddy, 2013) e pelas alterações de consciência, sensações e comportamentos causados por esta (Reddy, 2013).

A epilepsia é uma das principais doenças neurológicas existentes (Strzelczyk et al., 2008), afeta cerca de 65 milhões de pessoas no mundo (Jacobs et al., 2009; Hesdorffer et al., 2013). Esta patologia apresenta prevalência média de 0.52% na Europa, 0.68% nos Estados Unidos e 1.5% nos países em desenvolvimento (Strzelczyk et al., 2008).

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é a forma mais frequente de epilepsia na vida adulta (Hauser et al., 1996, Soukupová et al., 2014). Segundo Babb

(1999) a ELT afeta no mínimo 20% de todos os pacientes com epilepsia e corresponde a 41% de todos os casos de epilepsia grave, de acordo com Curia et al. (2014). As crises epilépticas são intratáveis por meio medicamentoso em 40% dos pacientes e destes, 70% apresentam esclerose hipocampal (EH) (de Lanerolle e Lee, 2005). As áreas cerebrais envolvidas na ELT são o lobo temporal medial/rede límbica, o qual envolve o hipocampo, amígdala, córtex entorrinal, córtex temporal lateral, tálamo medial e a parte inferior dos lobos frontais. Neste tipo de epilepsia as crises têm origem do hipocampo esclerótico, da amígdala ou de outras regiões do lobo temporal (de Lanerolle e Lee, 2005). Na ELT as crises se apresentam sob duas formas: parcial, quando a hiperexcitação neuronal se inicia de forma localizada em um hemisfério cerebral, podendo se espalhar por todo o encéfalo e; generalizada, quando se inicia de forma síncrona nos dois hemisférios cerebrais, afetando assim todo o encéfalo. A epilepsia parcial pode ainda ser classificada como simples (quando afeta um hemisfério cerebral), podendo se tornar secundariamente generalizada (quando afeta ambos hemisférios cerebrais) (Spencer, 2002).

A Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) é assim denominada nos casos em que a crise epiléptica tem origem no hipocampo esclerótico, sendo esta a sua característica neuropatológica mais comum (Babb et al., 1984). Mensurações do hipocampo de pacientes realizadas por meio de ressonância magnética funcional indicam que o grau de atrofia hipocampal não é proporcional à duração ou severidade das crises (Bower et al., 2000). Da mesma forma, (Cendes et al., 2014) relatam que indivíduos com ELTM com EH geralmente apresentam dano bilateral assimétrico.

1.1 Formação Hipocampal

A formação hipocampal, localizada na face medial do lobo temporal, é formada pelo hipocampo, adjacente ao giro parahipocampal, o giro dentado e a substância branca associada, o álveo, fímbria e fórnix. O nome hipocampo se origina do Latim (*Hippocampus*) devido a sua semelhança com um cavalo-marinho, o qual apresenta um focinho fino, pescoço em flexão, corpo roliço e cauda em curva (Kiernan, 2012).

O hipocampo é formado por quatro regiões ou setores denominados Corno de Amon (CA1, CA2, CA3, CA4) e o Giro Dentado (GD) (Cendes, 2014).

O hipocampo possui uma organização interna de três camadas, compostas principalmente por dois tipos celulares: as células granulares do giro dentado e as células piramidais do CA. Cada uma destas 3 camadas é subdividida em seis lâminas: 1) zona epitelial ou epêndima; 2) *álveus*; 3) *stratum oriens*; 4) *stratum pyramidale*; 5) *stratum radiatum*; e 6) *stratum lacunosum moleculare* (Andersen et al., 2000).

O giro dentado é formado por pequenas células denominadas células granulares. Acima destas está a camada molecular a qual apresenta terminais sinápticos da via perforante. Abaixo da camada de células granulares está o hilo (ou CA4) o qual é formado por interneurônios e células musgosas, as quais recebem aferências das células granulares (de Lanerolle e Lee, 2005).

A formação hipocampal mantém conexões com várias regiões do SNC por meio da via tri-sináptica, a principal via de eferência e aferência. Esta é composta por: 1) via perfurante, que comunica o córtex entorrinal com os dendritos proximais do GD; 2) fibras musgosas, axônios das células granulares do GD que fazem sinapse com as células piramidais de CA3 e; 3) via colateral de Schaffer, axônios que partem de CA3 e fazem sinapse com dendritos das células piramidais de CA1 (Andersen et al., 2000). As fibras que partem de CA1

fazem conexão com o córtex entorrinal diretamente ou por meio do subículo, sendo a principal via eferente do hipocampo (Andersen et al., 2000) (Figura 1).

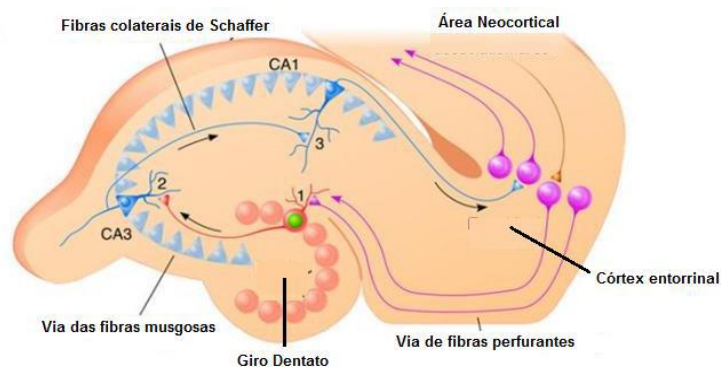


Figura 1. Conexões da formação hipocampal do rato, disposição das células granulares do giro dentado e colaterais de Schaffer. As fibras musgosas partem das células do giro dentado e se projetam para CA3, onde se localizam as células piramidais. http://www.iop.kcl.ac.uk/iopweb/blob/downloads/locator/l_622_Neurogenesis.jpg acessado em 18/02/17.

1.2 Fatores de Risco e o Desenvolvimento da Epilepsia

O histórico de pacientes e estudos em animais experimentais sugerem que as alterações morfológicas e funcionais características da ELT e ELTM são decorrentes de um evento epileptogênico inicial (Pitkänen e Sutula, 2002). Segundo Curia et al. (2014) as lesões precipitantes de um insulto cerebral podem ter origem a partir de crises febris (47% dos casos), trauma craniano (10% dos casos), lesões ao nascimento (19% dos casos) ou *status epilepticus* (SE) (15% dos casos) (Curia et al., 2014).

O SE é definido como uma crise prolongada, e é considerada uma emergência neurológica (Seinfeld et al., 2016). Segundo a ILAE (Trinka et al., 2015) dois momentos devem ser considerados quando se trata de SE: o primeiro diz respeito ao início do tratamento, o qual deve ocorrer 5 minutos após o início de um SE convulsivo (visto que estudos mostram que uma crise com duração de 5 min. provavelmente se tornará uma crise prolongada); o segundo é aquele em

que o SE é definido como uma crise com duração de 30 min e por suas consequências a longo prazo.

Outras patologias como as doenças cerebrovasculares, tumores encefálicos, alcoolismo, malformações corticais, e infecções do SNC, também são fatores de risco para o desenvolvimento da epilepsia. Em países menos desenvolvidos, infecções endêmicas tais como malária e neurocisticercose estão entre os maiores fatores de risco (Scorza et al., 2009).

As patologias citadas acima são consideradas fatores precipitantes para o desencadeamento da fase aguda no processo de desenvolvimento da epilepsia. Nesta fase inicial, a lesão cerebral tem como consequência a perda neuronal e astrocitária, acompanhada de processo inflamatório, lesão vascular e rompimento da barreira hematoencefálica, as quais seriam o fator desencadeante para as demais fases que culminariam no desenvolvimento da epilepsia. Na segunda fase, as lesões celulares e tecidual adquiridas são seguidas pelo processo de reparação tecidual, entretanto acompanhada por lesão neuronal ativa, induzindo o encéfalo ao desenvolvimento de uma área epileptogênica, caracterizada pela perda neuronal, neurogênese, brotamento axonal e ativação microglial. A terceira fase, onde há a persistência da lesão neuronal, culminaria no desenvolvimento da epilepsia. Nesta fase, denominada fase crônica, há brotamento axonal neuronal, seguido de seu rearranjo e a formação de uma nova rede neural, entretanto, desorganizada e não funcional, o que levaria, em última instância, a um padrão de disparo neuronal inadequado e a presença de um foco epilético (Figura 2).

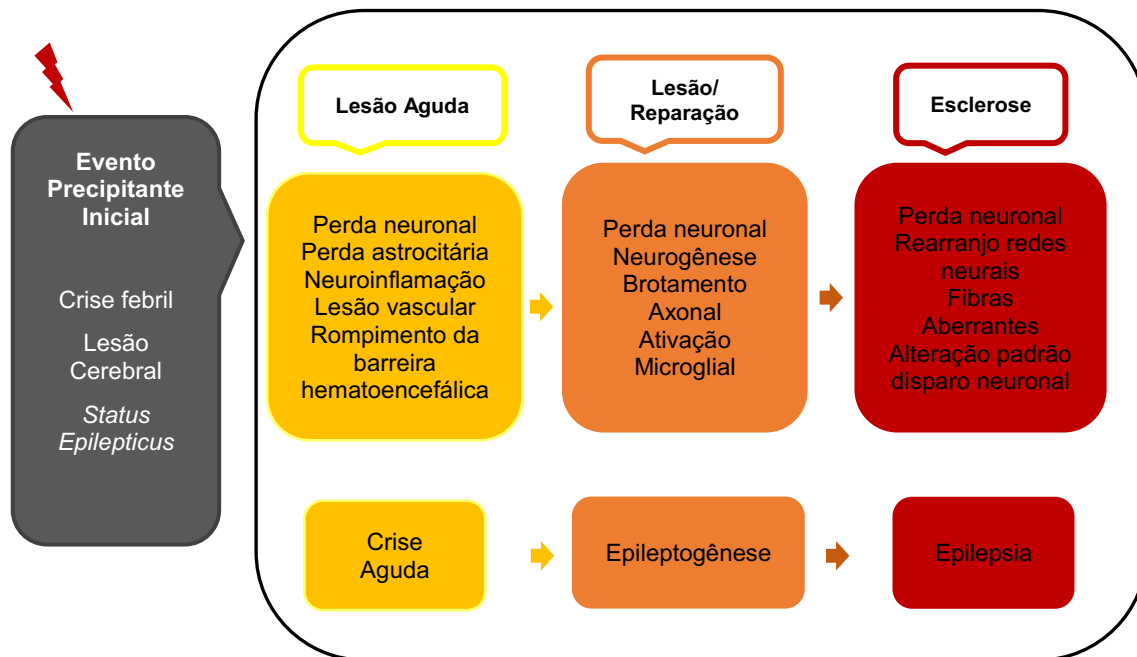


Figura 2. Patogênese e descrição das características histológicas da ELT. Modificada de Curia et al. (2014).

1.3 Fisiopatologia da Epilepsia

1.3.1 Alterações Morfológicas

Dentre as alterações celulares e tecidual encontradas na epilepsia podem ser citadas: a perda dos neurônios e interneurônios, incluindo mudanças no padrão de disparo neuronal em função de alterações na composição ou expressão de receptores e canais; a reação e adaptação celular em resposta à lesão, tal como brotamento das fibras musgosas e neurogênese, acompanhado de dispersão celular; a presença de gliose e consequentemente a alteração no funcionamento das células gliais; a perda da integridade da barreira hematoencefálica e; a neuroinflamação (Curia et al., 2014).

Estudo histopatológico realizado por Margerison e Corsellis (1966) em 55 cérebros de pacientes com ELT apontou como característica histopatológica

mais comum a perda das células musgosas do hilo do giro dentado, cuja alteração é denominada “esclerose endfolium”. Dentre outras alterações apontadas neste estudo estão a esclerose do Corno de Amon, a mais frequente, a qual se caracteriza por grave perda dos neurônios piramidais e gliose na região de CA1 (no prosúbulo, conhecido como Setor de Sommer) e, com menor frequência em CA3 (Curia et al., 2014). Autores descreveram que tais lesões associadas à ELT (Curia et al., 2014) e ELTM (Cendes, 2014) são bilaterais, entretanto, assimétricas.

Em relação a ELTM, a alteração neuropatológica mais comum é a EH (de Lanerolle e Lee, 2005), a qual é caracterizada pela perda celular neuronal acompanhada de astrogliose, que envolve astrócitos reativos e um padrão denso de cicatriz de aspecto fibrilar (de Lanerolle e Lee, 2005; Sofroniew et al., 2010; Kovacs et al., 2012). Além destas, o brotamento das fibras musgosas, células granulares dispersas (Cendes et al., 2014) e reorganização das interconexões neuronais podem estar presentes (Soukupová et al., 2014). A EH pode ainda afetar estruturas adjacentes do lobo temporal como o córtex entorrinal e a amígdala (Curia et al., 2014).

Estudos realizados a partir da análise do eletroencefalograma (EEG) de pacientes têm mostrado que o início da crise na ELTM nem sempre ocorre apenas no hipocampo afetado, mas pode envolver a amígdala, amígdala e hipocampo, giro parahipocampal, córtex entorrinal, região polar temporal, ínsula, o córtex perisilviano e, as vezes pode envolver uma rede epileptogênia complexa que inclui o córtex orbitofrontal, a ínsula e o opérculo frontal e parietal (Cendes, 2014).

1.3.2 Alterações Neuroquímicas

O controle da excitabilidade no cérebro de mamíferos é altamente dependente do principal neurotransmissor inibitório, o ácido γ -aminobutírico (GABA) (Soukupová et al., 2014). O GABA atua sobre seu receptor de mesmo nome, o γ -aminobutírico tipo A (rGABAA) o qual se caracteriza por um pentâmero com cinco unidades formando um canal de cloreto.

O desequilíbrio entre a inibição da atividade neuronal, mediada pelo neurotransmissor GABA, e a excitação, mediada pelo neurotransmissor excitatório glutamato, com maior ação deste, é o principal fator para o desencadeamento das crises epiléticas (Scorza et al., 2009; Pavlov e Walker, 2013; Seinfeld et al., 2016) ou por falha no término das crises, levando ao SE (Seinfeld et al., 2016). A perda da inibição mediada pelo GABA é geralmente a principal hipótese para explicar a hiperexcitabilidade neuronal (de Lanerolle e Lee, 2005).

O GABA uma vez em contato com seu sítio de ligação, localizado na interface entre as subunidades α e β de seu receptor (Reddy, 2011) medeia, por meio do influxo de cloreto, as inibições sinápticas ou fásica (rápida) e extra-sináptica ou tônica (prolongada) (Reddy, 2011; Pavlov e Walker, 2013; Seinfeld et al., 2016). O rGABAA pode apresentar inúmeras configurações, de acordo com a organização das dezesseis subunidades já identificadas (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ e π) (Reddy, 2011), as quais influenciarão diretamente na afinidade do rGABAA pelo seu ligante (Pavlov e Walker, 2013).

Além das alterações estruturais decorrentes das crises tais como, mudança nas propriedades neuronais, formação de conexões excitatórias, entre outras, há evidências de que a disfunção na sinalização GABAérgica tenha importante papel na patogênese da epilepsia e na geração das crises devido a perda de interneurônios inibitórios, com consequente redução no número de

sinapses GABAérgicas, contribuindo para a diminuição da inibição fásica e tônica (Pavlov e Walker, 2013).

Pouco é sabido sobre as mudanças dinâmicas do sistema GABAérgico no curso natural da ELT, entretanto estudos relatam que os interneurônios positivos para somatostatina e parvalbumina, os quais correspondem a um terço dos interneurônios GABAérgicos presentes no giro dentado, são particularmente vulneráveis ao insulto epileptogênico e morte, contribuindo para a redução da liberação de GABA no hipocampo e favorecendo a atividade epileptiforme (Soukupová et al., 2014).

1.3.3 Ação dos Hormônios Sexuais Femininos

Alguns hormônios esteróides gonadais apresentam propriedades neuroativas e podem influenciar a fisiopatologia da epilepsia por meio de sua ação sobre a modulação da excitabilidade neuronal (Herzog, 1995; Herzog, 2009; Reddy, 2011).

Estudos clínicos e experimentais sugerem que alguns hormônios esteróides gonadais são capazes de modular a neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica alterando assim a excitabilidade neuronal e o limiar para a ocorrência de crises (Joshi et al., 2013; Herzog e Frye, 2014; Herzog et al., 2015).

1.3.3.1 Estrogênios

Três diferentes tipos de hormônios estrogênios são descritos: estradiol, estrona e estriol. Os dois últimos são formados a partir da aromatização da androstenediona (androgênio) ou do metabolismo do estradiol. Apesar do menor conhecimento sobre estes dois hormônios em relação ao estradiol, acredita-se que apresentem efeitos sobre a excitabilidade neuronal, por meio da ativação do

receptor de estrogênio, apesar de inferior à ação do estradiol (Dey et al., 2000; Margeat et al., 2003).

O estradiol interage com receptores localizados na membrana celular, podendo gerar efeitos de curta duração (Velíšek e Velíšková, 2008; Herzog, 2009; Stevens e Harden, 2011). Este hormônio também apresenta sítio de ligação sobre o receptor de glutamato do tipo NMDA, aumentando os níveis de descarga dos neurônios durante o repouso em várias áreas do encéfalo, incluindo o hipocampo, atuando assim excitatoriamente sobre a membrana neuronal (Wong e Moss, 1992; Herzog, 2008a). No hipocampo, este hormônio aumenta a excitabilidade nos neurônios piramidais de CA1, induzindo a descargas repetitivas em resposta a estimulação das fibras colaterais de Schaffer (Wong e Moss, 1992; Herzog, 2008a).

A ação do estradiol por mecanismos gênicos, por meio de sua ligação a receptores localizados no citosol neuronal (Herzog, 2008a e 2009) ativa a transcrição e tradução de genes, gerando uma resposta de longa duração (Velíšek e Velíšková, 2008; Herzog, 2009; Stevens e Harden, 2011). Estes receptores se encontram em grande quantidade na região têmporo-límbica, especialmente nos núcleos amigdalóides medial e cortical e nas células piramidais do hipocampo e no subículo (Simerly et al., 1990; Herzog, 2008a).

O efeito proconvulsivante dos estrogênios parece ocorrer via redução na condução de cloreto pelos rGABAA e pela inibição da síntese de GABA. Além disto, o estradiol parece aumentar a resposta neuronal ao glutamato (Wallis e Luttge, 1980; Weiland, 1992; Stevens e Harden, 2011).

Estudos clínicos e experimentais demonstram o efeito excitatório dos estrogênios sobre o tecido nervoso. Logothetis et al. (1959) injetaram altas doses de estrogênios em mulheres com epilepsia e observaram descargas

epileptiformes interictais rápidas e aumento de crises durante a fase pré-menstrual. Backström (1976), também descreveu a relação existente entre os níveis de estrogênios e a exacerbação de crises.

Estudo de Woolley e McEwen (1993 e 1994) em ratas, demonstrou que o estradiol é capaz de estimular a produção de novos espinhos dendríticos nos neurônios piramidais de CA1 aumentando sua densidade e o número de sinapses contendo rNMDA, atuando, desta forma, sobre a plasticidade neuronal, o que poderia potencializar a excitabilidade dos neurônios hipocampais. A quantidade de espinhos dendríticos se correlacionou positivamente aos níveis séricos de estradiol durante o ciclo estral das ratas, o que poderia aumentar os impulsos excitatórios aferentes para CA1. Foi também demonstrado que a densidade dendrítica diminuiu após a ovariectomia das mesmas (Herzog, 2009).

Também são encontrados na literatura evidências sobre a característica inibitória (protetora) dos estrogênios sobre o sistema nervoso. Harden et al. (1999) e Peebles et al. (2000) relataram melhor controle das crises epiléticas durante o tratamento de reposição hormonal com base em estrogênios em mulheres na menopausa. Em adição, Janoušek et al., (2006) não observaram aumento das descargas ictais e interictais em nenhuma das seis mulheres com epilepsia tratadas com estrogênio.

Trabalhos experimentais também relatam a ação proconvulsivante dos estrogênios administrados de forma aguda (Woolley and Timiras, 1962; Edwards et al., 1999). Entretanto, outros relatos indicam que ao utilizarem os estrogênios de forma crônica, não foram observados efeitos de sua ação ou efeito anticonvulsivante (Velíšková et al., 2000; Tominaga, et al., 2001; Kalkbrenner and Standley, 2003).

Velíšková et al., (2010) descrevem que a ambiguidade dos efeitos dos estrogênios sobre as crises possa ter inúmeros fatores, tais como a dose, a duração do tratamento, o tipo de estrogênio utilizado, o tipo de crise apresentada, o sistema de neurotransmissor envolvido, gênero e a interação entre estrogênios e progesterona.

1.3.3.2 Progesterona

O hormônio progesterona e em especial o seu metabólito neuroativo, a alopregnenolona (AP), além de serem produzidos respectivamente nos ovários e glândulas adrenais, são produzidos no córtex cerebral e no hipocampo (Herzog, 2009). Ambos apresentam efeito protetor sobre as células neuronais (Herzog, 2009, Reddy, 2011; Stevens e Harden, 2011) o qual acredita-se ocorra devido a ação da AP sobre o rGABAA, por meio do qual aumenta a condutância de cloreto aumentando a inibição neuronal (Herzog, 2009; Stevens e Harden, 2011), diminuindo sua excitabilidade (Herzog e Frye, 2014) e aumentando o limiar para o ocorrência de crises (Reddy, 2009; Herzog e Frye, 2014).

A alotetrahidrodesoxicorticosterona (allo-THDOC), metabólito do mineralocorticóide deoxicorticosterona, a qual é sintetizada apenas nas glândulas adrenais (Herzog, 2009), juntamente com a AP, são dois dos esteróides neuroativos mais potentes, os quais atuam hiperpolarizando os neurônios hipocampais (Herzog, 2009) podendo exercer efeitos anticonvulsivantes (Reddy, 2011). Suas propriedades anticonvulsivantes são devido a sua conversão no cérebro em neuroesteróides (esteróides sintetizados no cérebro e que apresentam rápido efeito sobre a excitabilidade neuronal) (Reddy, 2011).

A AP e outros neuroesteróides atuam como moduladores alostéricos positivos e como ativadores diretos dos rGABAA (Reddy, 2011; Herzog et al., 2011; Herzog e Frye, 2014; Stevens e Harden, 2011). Sob condições fisiológicas a AP e allo-THDOC interagem com a subunidade δ dos receptores rGABAA extra-sinápticos, específicos para esteróides. Estes receptores estão localizados próximo aos receptores sinápticos, e uma vez estimulados facilitam a abertura de canais de cloreto e prolongam a ação inibitória do GABA nos neurônios (Herzog, 2009; Stevens e Harden, 2011; Reddy, 2011). Sob condições farmacológicas (concentrações micromolares), AP age diretamente no rGABAA induzindo a corrente de cloreto. Já a progesterona, age apenas fracamente no aumento da corrente de cloreto induzido pelo GABA e apenas em concentrações altas (Herzog, 2009).

Alguns efeitos dos hormônios estrogênio e progesterona podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito dos hormônios estrogênio e progesterona sobre o tecido nervoso.

Estrogênio	Progesterona
- redução do GABA	- aumento do GABA
- aumento do glutamato	- redução do glutamato
- aumento do metabolismo	- redução do metabolismo
- aumento do disparo neuronal	- redução do disparo neuronal
- aumento das crises	- redução das crises

GABA: ácido γ -aminobutírico Modificado de Herzog (2009).

2. Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e as Alterações Reprodutivas de Origem Hormonal na Epilepsia

A ação do sistema nervoso sobre as gônadas, via eixo hipotalâmico-hipofisário, e o efeito dos hormônios gonadais sobre a excitabilidade cerebral já eram pesquisados e relatados a partir da década de 40 (Spiegel e Wycis, 1945

apud Bäckström 1976; Ansell e Clarke, 1956 apud Bäckström, 1976; Logothesis et al., 1959; Wooley e Timiras, 1962; Laidlaw, 1965; Morrell et al., 2002).

Em função da extensa conexão entre o córtex límbico e o hipotálamo (Stuenkel, 1991; Van de Pol and Van Goozen, 1992), as alterações límbicas repercutem sobre a liberação dos hormônios hipotalâmicos e, da mesma forma, a ação deste sobre a liberação das gonadotrofinas hipofisárias, o que tem como consequência alterações ovulatórias (Herzog, 1989). Tal achado partiu da observação da maior ocorrência dos ciclos anovulatórios em mulheres com ELT, do que naquelas com epilepsia idiopática generalizada (Herzog, 1993).

A epilepsia afeta igualmente cerca de 50 milhões de homens e mulheres em todo o mundo (Thomas, 2011). Tanto homens como mulheres com epilepsia podem apresentar alterações de ordem reprodutiva. Nas mulheres as alterações do sistema reprodutor se manifestam, de uma forma geral, sob a forma de alterações menstruais, infertilidade e hirsutismo (presença de pêlos em locais característicos de distribuição masculina). Nos homens, as alterações podem incluir a perda da libido, impotência e infertilidade. Estudos relatam que a redução da libido pode afetar entre 20-71% dos homens com epilepsia, além disto, 90% deles podem apresentar alterações no sêmen tais como menor número de espermatozóides, morfologia anormal ou prejuízo de sua mobilidade (Herzog, 2008b).

Estudos comparativos entre mulheres com e sem epilepsia demonstram que as alterações menstruais são mais comuns entre mulheres com epilepsia do que na população em geral (Herzog, 2008b; Verrotti et al., 2011). Tais alterações podem afetar um terço das mulheres com epilepsia (Herzog, 2008a), alcançando até 50% desta população (Singh et al., 2011). Além disto, mulheres com ELT

apresentam redução na fertilidade entre 69-85% quando comparado com mulheres sem epilepsia (Herzog, 2008a).

Dentre as alterações menstruais existentes estão: amenorréia (ausência de menstruação por 6 meses), oligomenorréia (ciclos menstruais com intervalos maiores de 32 dias), polimenorréia (ciclos menstruais com intervalos menores do que 26 dias) e menometrorragia (menstruações exacerbadas e sangramento entre as menstruações) (Herzog, 2008b).

A síndrome do ovário policístico, alteração reprodutiva mais comum nas mulheres, afeta 10-20% daquelas com epilepsia e 5-6% daquelas sem a patologia (Herzog, 2008a).

2.1 Estrogênios e Progesterona e as Alterações do Ciclo Menstrual na Epilepsia

O ciclo menstrual, devido as flutuações nos níveis hormonais, é um fenômeno capaz de influenciar a ocorrência de crises (Herzog, 2008a; Herzog et al., 2015). A epilepsia catamenial se refere a crises que ocorrem de forma cíclica em relação ao período menstrual, sendo assim, tendem a se apresentar de forma mais frequente em uma das fases do ciclo menstrual (Herzog, 2008a) (Figura 3). Estudos de Herzog (2008a) apontam que este padrão no aparecimento das crises afeta 35% das mulheres com epilepsia, podendo ser encontrado em até 38% destas, de acordo com trabalho recentemente publicado (Herzog et al., 2015). Três padrões de epilepsia catamenial são descritos na literatura: 1) perimenstrual: quando a exacerbação no número de crises ocorre a partir do 3º dia prévio ao início da menstruação e perdura até o 3º dia do ciclo menstrual. Este padrão, identificado em mulheres que apresentam ciclo menstrual normal, caracteriza-se pela brusca queda nos níveis séricos de progesterona e redução

temporária na proporção entre os hormônios estradiol e progesterona. A maior concentração sanguínea do estradiol, estaria envolvido na maior ocorrência de crises nesta fase, visto que este hormônio apresenta possível efeito epileptogênico; 2) periovulatório: quando o maior número de crises ocorre durante o período ovulatório, entre o 10º-13º dias após o 1º dia da menstruação. Este padrão, também identificado em mulheres que apresentam ciclo menstrual normal, caracteriza-se pela elevação abrupta dos níveis de estradiol, o qual é acompanhado da elevação dos níveis de progesterona após a ocorrência da ovulação. A menor proporção hormonal observada durante a elevação do estradiol até a posterior elevação da progesterona pós ovulação, é a responsável pelo aparecimento de crises nesta fase e; 3) luteal, é identificado em mulheres com fase lútea inadequada e a evidência da maior ocorrência de crises entre o 10º dia após a menstruação e o 3º dia prévios ao início do próximo ciclo menstrual. Este padrão, decorrente de ciclos irregulares, caracteriza-se por ciclos anovulatórios e exibe a menor proporção entre os hormônios estradiol e progesterona, por se tratar de um padrão onde os níveis de estradiol se mantêm elevados e os de progesterona se mantêm baixos durante todo o ciclo (Herzog, 2008a).

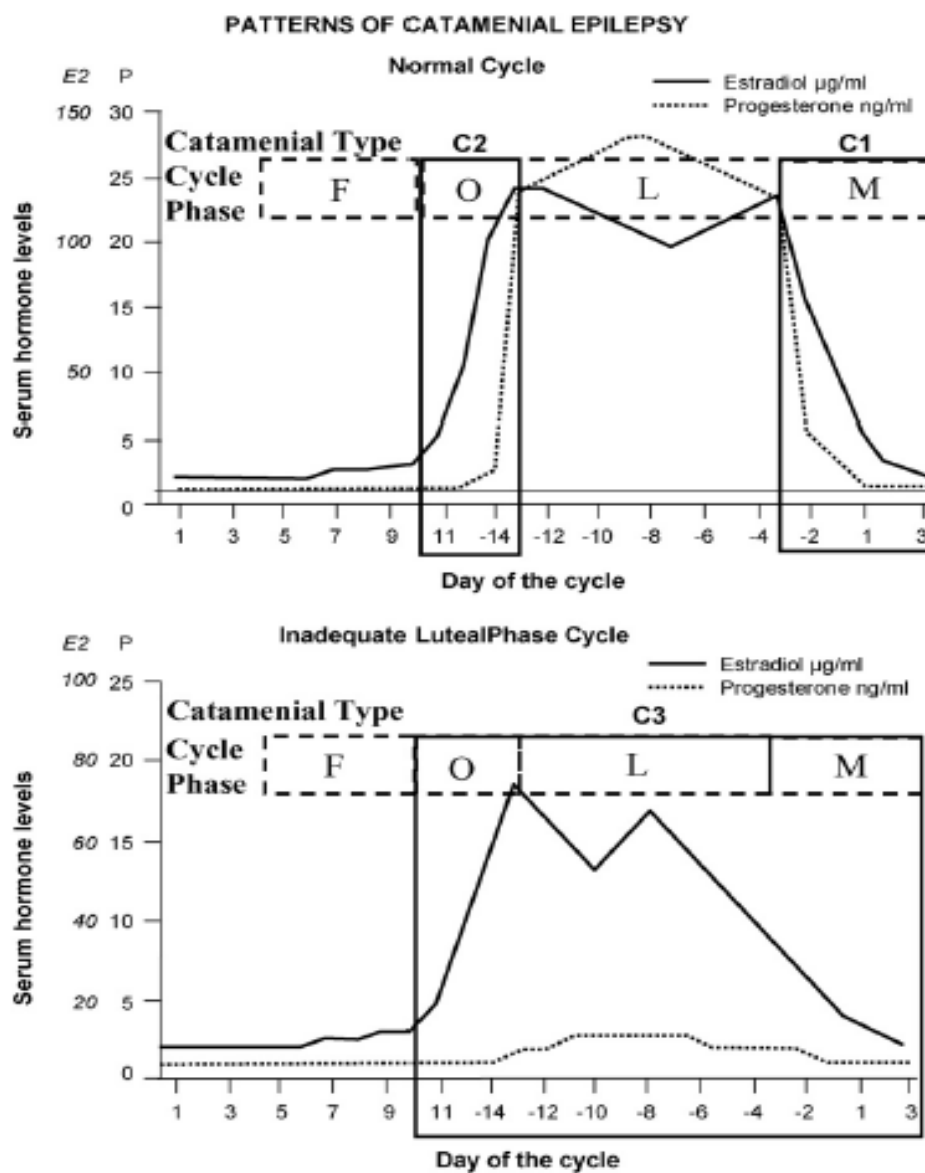


Figura 3. Níveis de estradiol e progesterona durante um ciclo menstrual normal (figura acima) e durante um ciclo com fase lútea inadequada (abaixo). As fases do ciclo são representadas letras F (follicular), O (ovulatória), L (lútea) e M (menstrual). Os três padrões de epilepsia catamenial são: perimenstrual (C1), periovulatório (C2) e fase lútea inadequada (C3). Retirado de Herzog (2008a).

Com o intuito de dirimir dúvidas sobre a ocorrência de crises epiléticas a partir de um calendário circalunar conforme descrito por Quigg et al. (2008) e a periodicidade destas relacionadas ao ciclo menstrual, Herzog et al. (2015) realizaram novo estudo onde foi confirmada a existência da epilepsia catamenial. Neste estudo, 100 mulheres com crises epiléticas foram avaliadas ao longo de três ciclos menstruais. Os resultados apontaram o 1º dia do ciclo como o dia com

maior número de crises, como consequência de uma queda nos níveis séricos de progesterona na fase pré-menstrual (final da fase lútea e início da fase menstrual), a qual pode influenciar a composição das subunidades do rGABAA em uma forma menos sensível às medicações benzodiazepínicas e à neurotransmissão mediada pelo GABA. Já o dia com menor frequência de crises se deu no 6º dia após a ovulação, onde há uma menor proporção nos níveis séricos de estradiol/progesterona durante o ciclo menstrual, com maior índice sérico do segundo, tal como ocorre no meio da fase lútea.

3. Modelo Experimental de Epilepsia utilizando a Pilocarpina

O uso de modelos experimentais em ratos, tal como o modelo da Pilocarpina (Pilo), induz no animal o aparecimento de crises límbicas possibilitando o estudo dos mecanismos neuropatológicos da ELT (Cendes et al., 2014).

O modelo experimental da Pilo foi inicialmente descrito em ratos por Turski et al. (1983). A Pilo é um potente agonista muscarínico colinérgico extraído da planta *Pilocarpus jaborandi* (Funari e Ferro, 2005), encontrada na América do Sul. Esta droga, quando administrada ao animal experimental por via intracerebral ou sistêmica, leva ao desequilíbrio do sistema colinérgico, desenvolvendo atividades epileptiformes no cérebro do animal (Turski et al., 1983). A Pilo, ao ser aplicada em ratos adultos leva o animal a apresentar alterações comportamentais e eletroencefalográficas (Turski et al., 1983; Cavalheiro, 1995). Neste modelo de epilepsia, a administração local ou sistêmica da Pilo conduz o animal a um padrão de crises límbicas repetidas que culminam no SE, que pode durar várias horas (Cavalheiro et al., 1982; Turski et al., 1983; Leite et al., 1990; Furtado et al., 2002).

O modelo experimental de epilepsia induzida por Pilo mimetiza algumas das características encontradas no humano tais como comportamentais, eletrográficas e patológicas (Cavalheiro et al., 1994). A importância de seu uso está em, além de melhorar a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que a envolvem, possibilitar o desenvolvimento de drogas anti-epilépticas (DAEs).

Este modelo apresenta três diferentes períodos com duração e características específicas, os quais são denominados, agudo, silencioso e crônico (Turski et al., 1983; Leite et al., 2002). O período agudo, com duração de 8-16h, é caracterizado por alterações eletroencefalográficas hipocampais e corticais imediatamente após a administração da droga, as quais culminam em crises eletroencefalográficas (Turski et al., 1983; Cavalheiro, 1995). Além destas, alterações comportamentais tais como, a acinesia, olhar fixo, automatismos mastigatórios, mioclonia da musculatura facial, *wet dog shakes* (Turski et al., 1983) e crises motoras de origem límbica, que se desenvolvem em 1-2h, e progridem para estado de mal epiléptico límbico ou SE, (Turski et al., 1983; Cavalheiro, 1995) são característicos deste período.

O SE induzido pela Pilo pode modificar inúmeras vias de sinalização no SNC. A Pilo pode atuar nos receptores muscarínicos M1 e M2, ao atuar sobre M2 a adenilato ciclase é inibida, diminuindo a liberação de acetilcolina e a excitabilidade neuronal. Em contrapartida, ligando-se aos receptores M1, a Pilo ativa a fosfolipase C e assim produz diacilglicerol (DG) e inositoltrifosfato (IP3), o qual resulta na alteração da corrente de Ca^{2+} e K^{+} , aumentando a excitabilidade cerebral (Segal, 1988). O aumento da excitabilidade possivelmente ocorre devido a redução da atividade das ATPases no hipocampo, a qual não poderia repolarizar a membrana plasmática nem promover a extrusão do cálcio (Fernandes et al., 1996; Funke et al., 2003). A alta concentração de Ca^{2+} promove

a alta liberação de glutamato, agindo nos receptores AMPA/KA, permite a entrada de Na^+ e Ca^{2+} na célula, e como consequência, o Mg^{2+} , o qual bloqueia o receptor N-metil-D-aspartato (rNMDA) é removido, induzindo a ativação deste receptor pelo glutamato e permitindo a entrada de mais Ca^{2+} na célula pós-sináptica, a qual induzirá a excitotoxicidade e morte celular.

Lemos e Cavalheiro (1995) observaram alterações morfológicas, tais como o brotamento das fibras musgosas, no tecido cerebral de ratos mantidos no mínimo por 1h em SE, as quais se tornaram mais pronunciadas a partir de 2h de SE. Este trabalho demonstrou que quanto maior o tempo em SE, menor será a latência para a ocorrência de crises espontâneas e recorrentes (CERs) e mais frequentes estas serão durante a fase crônica deste modelo.

O período silencioso é aquele que se segue ao agudo e tem duração de 4-44 dias. É assim denominado pois nesta fase os animais não apresentam alteração comportamental ou do registro eletroencefalográfico (Cavalheiro et al., 1991; Cavalheiro, 1995). É possível que neste período ocorra intensa alteração molecular, a qual contribui no processo de epileptogênese (Leite et al., 2002).

Após o período silencioso, com o aparecimento da primeira crise espontânea (CE), que ocorre de 5-45 dias após a administração da Pilo, o animal adentra o terceiro período do modelo, denominado período crônico, o qual é caracterizado pela recorrência de crises que perduram por toda a vida do animal (Cavalheiro et al., 1991; Cavalheiro, 1995; Amado e Cavalheiro, 1998). O desenvolvimento de crises espontâneas ocorre devido a uma atividade paroxística localizada na formação hipocampal (Cavalheiro et al., 1991; Cavalheiro, 1994). O fato desta atividade não ser restrita ao hipocampo, podendo se espalhar para o córtex cerebral (Cavalheiro, 1994), caracteriza a formação hipocampal como uma estrutura importante na organização da atividade

epiléptica no modelo da epilepsia. As CERs, características do período crônico são similares às observadas em ratos submetidos ao modelo experimental de *kindling*, ou seja, alcançam estágio 5 de Racine, podem ter duração de 40-80s e se repetem em média de 3-5 vezes na semana (Cavalheiro et al., 1991; Cavalheiro, 1995). A frequência e o padrão das crises epilépticas podem variar entre os animais, desde algumas crises ao longo de várias semanas, como crises repetitivas em curtos períodos de tempo (Scorza et al., 2009).

O insulto excitotóxico desencadeado pelo SE induzido pela Pilo leva a um dano celular que se instala de minutos a horas após a administração da droga e também resulta em um prolongado processo neurodegenerativo que pode se estender por semanas a meses (Turski et al., 1983; Leite et al., 1990; Cavalheiro 1995; Scorza et al., 2009).

Alterações neuropatológicas tais como perda neuronal em vários subcampos do hipocampo e a reorganização das fibras musgosas da camada molecular da fásia dentada é observada no modelo experimental da Pilo e é similar à esclerose hipocampal encontrada em pacientes com ELT (Mello et al., 1993; Leite et al., 2002).

3.1 Modelo da Pilo em Fêmeas

Ao estudar o modelo da Pilo em fêmeas Amado e Cavalheiro (1998) identificaram os mesmos padrões comportamentais descritos em machos porém, algumas diferenças importantes foram encontradas e devem ser consideradas.

No período agudo foram observados acinesia, automatismos faciais e crises límbicas caracterizadas por clônus das patas anteriores com o animal sobre as duas patas traseiras, salivação, movimento mastigatório e queda. As

crises límbicas ocorreram a cada 2-8min e evoluíram para o SE, o qual teve duração de 8-12h. Após o SE, os autores observaram que os animais se tornaram irresponsivos, acinéticos e em estado comatoso. Tais características perduraram por 24-48h, quando então o comportamento das fêmeas retornou ao normal, originando o período silencioso.

O período silencioso do modelo da Pilo em fêmeas é caracterizado por ausência de manifestações de origem epiléptica, teve duração de 10-22 dias e ao seu término originou a fase crônica do modelo. Esta fase teve início quando do aparecimento da primeira CE e que recorreram com uma frequência de 2-4 por semana em um período de 6 meses.

Amado e Cavalheiro (1998) estudaram o mecanismo fisiopatológico das crises epiléticas sobre a liberação hormonal no modelo experimental da Pilo em fêmeas. Os autores observaram que o SE afetou o ciclo estral levando a um aumento das fases de estro e diestro e diminuição das fases de metaestro e proestro na 1ª quinzena após a injeção de Pilo; e, na 2ª e 3ª quinzenas, um aumento no diestro e redução da fase de proestro, o que sugere ciclo estral anovulatório e fase lútea inadequada nestas ratas. Quanto aos hormônios ovarianos foi observado aumento significativo nas concentrações de estradiol e redução nas concentrações de progesterona durante o período crônico do modelo experimental. Constataram ainda redução dos hormônios hipofisários LH e FSH nas fêmeas epiléticas e não encontraram diferença significativa na concentração de prolactina entre os animais Pilo e salina.

Amado e Cavalheiro (1998) em estudo sobre a relação entre epilepsia e prenhez, observaram redução da frequência de crises durante a prenhez, indicando que este estado leva a alterações hormonais com possível efeito protetor sobre o cérebro da rata.

O modelo da Pilo em fêmeas tem sido amplamente utilizado em estudos direcionados à compreensão dos efeitos dos hormônios ovarianos sobre a epilepsia. Valente et al. (2002) estudaram o efeito da retirada dos hormônios ovarianos por meio da castração sobre os parâmetros observados no modelo da Pilo em fêmeas. Foram observadas redução na latência para o desenvolvimento do SE, aumento da mortalidade, diminuição na latência para a primeira crise espontânea, maior morte das células hipocampais e maior marcação das fibras musgosas quando comparado a fêmeas não castradas e a machos. Valente et al. (2008) observaram que a reposição hormonal, por meio da aplicação de medroxiprogesterona associada a 17β -estradiol em ratas epiléticas previamente castradas, reduziu o número de crises na fase crônica do modelo experimental e também o brotamento das fibras musgosas hipocampais.

Com a finalidade de estudar o hipoestrogenismo, característico da menopausa, e sua relação com a epilepsia, Pereira Jr. et al. (2009) administraram estrogênio conjugado de equino a fêmeas epiléticas castradas. Os autores observaram efeitos protetores do estrogênio tais como: a) redução no número de crises no período pós-ovariectomia em relação ao período pré-ovariectomia; b) menor brotamento de fibras musgosas e efeito protetor sobre a área CA1 do hipocampo quando comparadas à fêmeas tratadas com veículo.

Disfunções reprodutivas e endócrinas de origem epileptogênica tais como alterações do ciclo estral, liberação hormonal e alterações gestacionais também foram identificadas em fêmeas submetidas a modelos experimentais de crises límbicas (Cramer e Jones, 1991; Amado et al., 1993; Amado e Cavalheiro, 1998; Edwards, 1999).

Além disto, estudos experimentais realizados em fêmeas tratadas com Pilo, ácido caínico entre outros modelos, têm demonstrado o efeito anticonvulsivante da AP e allo-THDOC sobre as crises e SE (Herzog, 2009).

3.2 Controvérsias quanto a ocorrência de crises espontâneas e recorrentes em animais que não apresentaram *Status Epilepticus* no modelo de epilepsia induzido pela Pilocarpina

Um achado experimental bastante inesperado foi encontrado por Navarro et al. (2009) ao identificarem a fase crônica do modelo de ELT em ratos injetados com Pilo (380mg/kg) que não apresentaram SE. Este achado foi surpreendente visto que de forma geral os animais sem SE (SSE) são descartados (tendo em vista não terem apresentado a fase aguda do modelo e, portanto, não se espera que os mesmos venham a apresentar o período crônico) ou, são estudados à parte, quanto a possíveis aspectos relacionados a mecanismos de resistência à epilepsia.

É importante destacar que inúmeros grupos de pesquisa voltados ao estudo da epilepsia utilizam como ferramenta experimental o modelo da Pilo. Raramente nestes trabalhos é relatado o percentual de animais injetados que não apresentaram SE, apesar desta ocorrência ser comum neste modelo animal. Estudos em nosso laboratório utilizando este modelo em ratas, demonstrou que 47% daquelas injetadas não desenvolvem SE (Pereira Jr. et al., 2009). Scharfman et al. (2001) observaram que 40% dos ratos que receberam Pilo (380mg/kg, i.p.) não apresentaram SE, enquanto este número atingiu o percentual de 88% ao aplicar Pilo (350mg/kg, i.p.) em fêmeas no dia do estro do ciclo estral (Scharfman et al., 2005). Já Vannucci Campos et al. (2017) ao injetar

Pilo (350mg/kg, i.p.) em fêmeas, observaram que apenas 14% não desenvolveram SE.

Desta forma, o entendimento do que de fato ocorre com aqueles animais que não apresentaram SE após a Pilo é de fundamental importância tanto pela possibilidade destes virem a apresentar epilepsia mais tardiamente, quanto pela própria compreensão da fisiopatologia da epilepsia, para que assim sejam desvendados os possíveis fatores neuroproterores que possam representar os mecanismos de resistência à epilepsia.

Os animais do estudo de Navarro et al. (2009) foram acompanhados por meio de EEG e videomonitoração, a qual foi realizada nos primeiros 5 dias de cada mês, ao longo de 12 meses. Os autores descreveram ter observado em média 0,5-1 CER por semana, as quais se iniciaram entre o 6º-10ºmpp e persistiram por todo experimento. Dentre os achados a partir da avaliação por ressonância magnética, foram identificadas áreas hiperdensas no neocórtex, cortices rinal e piriforme, bem como no hipocampo e tálamo ântero-medial de animais SSE. Estes achados geralmente estão associados a um aumento de líquido intersticial associado ao desenvolvimento de edema vasogênico. O volume sanguíneo cerebral também foi avaliado neste trabalho. Os autores observaram que o córtex somatossensorial e áreas límbicas apresentaram aumento do volume sanguíneo em machos SSE após um ano do tratamento com a Pilo.

Em adição, Scharfman et al. (2001) estudaram a fisiologia das células musgosas em ratos após serem induzidos ao modelo de ELT por meio do uso da Pilo (380mg/kg). Dentre os 14 animais injetados, 8 desenvolveram SE e se tornaram epiléticos, 6 não desenvolveram SE (SSE) e 7 receberam salina (controle). Os 14 animais injetados receberam Diazepam 1h após a Pilo (SE e

SSE). Após a injeção da Pilo os animais foram observados no período das 7-20h e foram considerados epiléticos após a ocorrência de três CERs. Os estudos histológicos e eletrofisiológicos foram realizados em todos os grupos entre 1-6 meses após injeção da Pilo. À marcação com NeuN os autores observaram que 3 dos 6 animais SSE apresentaram perda de células do córtex entorrinal medial. À imunohistoquímica para neuropeptídeo Y (NPY), foi observada marcação celular no hilo do giro dentado e brotamento das fibras musgosas na camada molecular em 1 dos 6 animais SSE. Este achado pode sugerir a ocorrência de crises, visto que segundo Lurton e Cavalheiro (1997) e Sperk et al. (1996), as células musgosas produzem NPY após as crises. Ao analisar potenciais de ação espontâneos e evocados, os autores observaram que as células musgosas de animais epiléticos eram capazes de gerar pulsos espontâneos e de forma periódica. Já as mesmas células de ratos SSE não apresentaram o mesmo padrão espontâneo. Entretanto, o estímulo evocado sobre a camada molecular foi capaz de gerar a atividade em uma célula musgosa. No mesmo animal foi ainda observada perda celular no hilo do giro dentado (NeuN), bem como brotamento das fibras musgosas (NPY).

Justificativa

II. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista os dados mostrando:

- a ocorrência tardia de CERs em animais que não apresentaram SE no modelo de epilepsia induzido por Pilo (Navarro et al, 2009);

- o não desenvolvimento de SE em 47% das fêmeas submetidas ao modelo experimental por Pilo (Pereira Jr. et al., 2009) e de Scharfman et al. (2001 e 2005), onde, neste último, este porcentual variou de 40-88% das fêmeas injetadas e;

- o efeito neuroprotetor dos hormônios sexuais no modelo da epilepsia induzido por Pilo em fêmeas (Valente et al., 2008 e Pereira Jr. et al. (2009); levantamos as seguintes questões:

- 1) Haveria ocorrência de crises epiléticas em fêmeas que não apresentaram SE após a indução do modelo da Pilo se fosse feita uma observação mais duradoura (até 1 ano após a indução)?;
- 2) A manutenção (ou não) da regularidade do ciclo estral em fêmeas que receberam Pilo e não apresentaram SE poderia estar relacionada (ou não) a possível ocorrência de crises espontâneas e recorrentes? e;
- 3) A ovariectomia antes ou após a indução do modelo da Pilo em fêmeas (representando a retirada dos hormônios como componente neuroprotetor) poderia facilitar esta ocorrência?

Objetivos

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a possível ocorrência de CERs no período de 1 ano de observação em ratas que foram submetidas ao modelo da pilocarpina mas não desenvolveram SE, e o possível papel dos hormônios gonadais femininos ou de sua retirada pela ovariectomia.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a regularidade do ciclo estral após a indução do modelo da Pilo em ratas que apresentaram SE;

- Verificar a regularidade do ciclo estral após a indução do modelo da Pilo em ratas que não apresentaram SE;

- Investigar se ratas que não apresentaram SE após a indução do modelo da Pilo apresentarão CERs;

- Observar se fêmeas ovariectomizadas previamente à injeção da Pilo, e que não apresentaram SE, apresentarão CERs;

- Observar se fêmeas ovariectomizadas posteriormente à injeção da Pilo, e que não apresentaram SE, apresentarão CERs;

Materiais e Métodos

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Os experimentos realizados durante o desenvolvimento desta tese envolveram o uso de ratas Wistar adquiridas no Centro de Desenvolvimento em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME-UNIFESP). O trabalho foi iniciado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional da UNIFESP, sob o protocolo de número 0211/12.

Nesta pesquisa foram utilizadas ratas adultas, entre 60 e 70 dias de idade, pesando entre 240-280g. Foram selecionadas para o trabalho apenas fêmeas com ciclo estral regular comprovado por meio do estudo colpocitológico, conforme descrito por Tanno et al. (2002). Durante todo o experimento os animais foram mantidos em condições ambientais controladas de ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso à ração e água. Durante o desenvolvimento desta tese todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais a serem utilizados, eutanasiados desnecessariamente e, da mesma forma, reduzir o sofrimento destes.

4.2 Grupos Experimentais e Controle

As fêmeas com ciclo estral regular selecionadas para este trabalho foram organizadas nos seguintes grupos (Figura 4):

SE: fêmeas que foram submetidas ao modelo experimental de ELT e desenvolveram SE.

SEOVX: fêmeas submetidas ao modelo experimental de ELT que desenvolveram SE e foram ovariectomizadas 72h após o SE.

OVXSE: fêmeas ovariectomizadas, que receberam Pilo 6 dias após a ovariectomia e desenvolveram SE.

SSE: fêmeas que receberam a injeção de Pilo e não desenvolveram SE.

SSEOVX: fêmeas submetidas ao modelo experimental de ELT que não desenvolveram SE e foram ovariectomizadas 72h após a injeção de Pilo.

OVXSSE: fêmeas ovariectomizadas, que receberam Pilo 6 dias após a ovariectomia e não desenvolveram SE.

CTL: grupo controle, fêmeas que receberam injeção de salina ao invés de Pilocarpina.

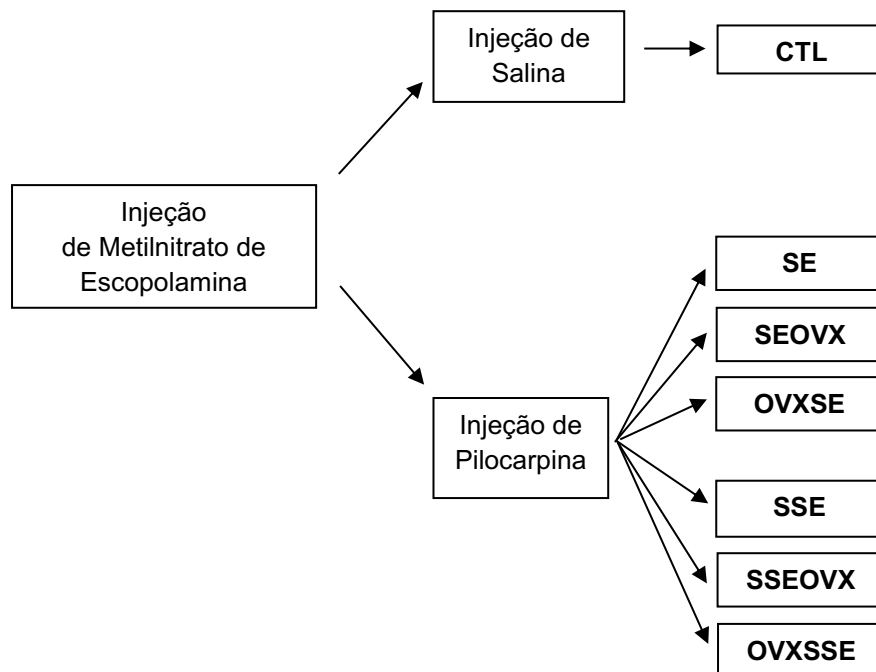


Figura 4. Representação esquemática do tratamento aplicado aos animais experimentais e controle.

4.3 Estudo Colpocitológico

Após serem trazidas ao biotério da Disciplina de Neurociências, foram concedidas às ratas entre 2-4 dias para ambientação ao local antes de serem iniciadas as manipulações. Cumprido este período foi realizado o estudo colpocitológico onde, por meio da técnica de esfregaço vaginal, pôde-se observar a regularidade do ciclo estral das fêmeas trazidas do CEDEME-

UNIFESP. O ciclo estral regular é definido pelo aparecimento da fase estro (células queratinizadas presentes no esfregaço vaginal) a cada 3 ou 4 dias (Bingel e Schwartz, 1969). Este procedimento é realizado coletando-se o conteúdo do canal vaginal utilizando-se uma ponteira e uma pêra de sucção, ou uma pipeta, contendo cerca de 20uL de água destilada. A solução coletada foi colocada sobre uma lâmina de vidro e levada ao microscópio de luz para observação da morfologia celular, sem a necessidade do uso de corante (Marcondes et al., 2002). Este procedimento foi realizado diariamente entre 8 e 10 horas da manhã durante duas semanas e ao término deste período as fêmeas com ciclo estral regular foram incluídas no experimento. Após a injeção de Pilo ou salina, os animais tiveram o ciclo estral avaliado ao longo de um ano, com a finalidade de observar a regularidade do mesmo durante o período de experimentação.

4.4 Aplicação do Modelo Experimental de Epilepsia do Lobo Temporal

As ratas incluídas neste estudo foram submetidas ao modelo de ELT por meio de injeção intraperitoneal (ip.) de cloridrato de Pilocarpina (Pilo) (Sigma), em uma concentração de 4%, e dose 360 mg/kg.

Trinta minutos antes da Pilo as ratas receberam injeção subcutânea (sc.) de metilnitrato de escopolamina (Sigma), dose 1mg/kg, com a finalidade de reduzir os efeitos colinérgicos da Pilo sobre o sistema nervoso periférico. Tais efeitos se traduzem por aumento da produção de secreção pulmonar, taquicardia e relaxamento dos esfíncteres urinário e anal, os quais poderiam levar ao maior sofrimento do animal e até mesmo a morte durante o período de SE.

O desenvolvimento do SE foi observado no animal por meio da ocorrência de crises comportamentais ininterruptas, as quais foram mantidas por 4 horas

(grupo SE). Após este período, as fêmeas que atingiram o SE receberam injeção ip. de Diazepam (1mg/kg, ip, Santisa) e Tiopental (30mg/kg, ip., Cristália). Estas drogas foram escolhidas devido seus efeitos sedativo, miorelaxante e anticonvulsivante, do benzodiazepínico (Diazepam), e sedativo-hipnótico, do barbitúrico (Tiopental).

As fêmeas que receberam Pilo e não desenvolveram SE, ou que desenvolveram crises que se caracterizaram por início e término sem que fosse observada sua continuidade, foram classificadas como não apresentando SE (grupo SSE).

Após a indução do modelo experimental de ELT e sedação, todas as ratas SE e SSE foram hidratadas com soro fisiológico 0,9% (Farmax), 3mL ip. e 1mL sc e foram alocadas individualmente em gaiolas revestidas com jornal.

A partir do 1º dia após a indução do modelo as ratas foram hidratadas e alimentadas com farelo de ração misturado à água de beber, manualmente pelo pesquisador, por 4-5 vezes ao dia, até que as mesmas estivessem aptas a realizar tais funções voluntariamente.

As fêmeas do grupo controle receberam injeções de salina ao invés de Pilo. O tratamento com Pilo ou salina foi realizado no dia de estro do ciclo estral (Amado e Cavalheiro, 1998).

4.5 Ovariectomia

A ovariectomia foi realizada em 4 grupos experimentais (SEOVX, OVXSE, SSEOVX e OVXSSE). As fêmeas dos grupos experimentais OVXSE e OVXSSE foram submetidas à ovariectomia 6 dias antes da injeção de Pilo e após, apresentaram diestro constante ao esfregaço vaginal. Nos grupos SEOVX e

SSEOVX o procedimento de ovariectomia foi realizado 72 horas após a injeção de Pilo.

Para a realização da ovariectomia as fêmeas foram anestesiadas com cloridrato de cetamina (75mg/kg, ip., Syntec) e cloridrato de xilazina (12mg/kg, ip., Syntec). Após anestesiadas as fêmeas foram posicionadas em decúbito dorsal sobre a bancada esterilizada e realizada a tricotomia 1 a 2 cm acima dos órgãos genitais. O local foi limpo com iodo e realizada a incisão de aproximadamente 1 cm de extensão na pele e cerca de 1,5 cm de extensão na musculatura. Após o afastamento da musculatura os cornos uterinos e ovários foram identificados e apoiados sobre um tecido cirúrgico estéril posicionado sobre o ventre do animal de forma que houvesse boa visualização dos mesmos. A seguir, a extremidade dos cornos uterinos foram suturados com fio absorvível e os ovários foram removidos com uma tesoura cirúrgica. Extirpadas as gônadas, a sutura muscular e da pele foram realizadas com fio absorvível e de nylon, respectivamente. Ao término da sutura era realizada a limpeza com água e a cicatriz coberta com iodopovidine. Os materiais cirúrgicos utilizados no procedimento eram previamente autoclavados com a finalidade de evitar infecção.

4.5.1 Cuidados pós-ovariectomia

Com o intuito de diminuir o desconforto das fêmeas no pós-operatório (PO), foi administrado ibuprofeno (50mg/mL, Medley) 20mg/kg em dose única por via oral 3-4h após o despertar da anestesia e, do 1º-5º PO, foi adicionado 1mL de Ibuprofeno à garrafa de água das fêmeas (500mL), o que forneceu a estes animais a dose de 12mg/kg/dia.

A atrofia genital pós-ovariectomia foi confirmada pelo esfregaço vaginal, por meio da observação da presença de células leucocitárias em grande quantidade, observadas a partir do 4º dia de pós ovariectomia, caracterizando o diestro permanente o que indica a presença de anovulação (McGinnis et al., 1981).

4.6 Sistema de videomonitoração

Cerca de uma semana a um mês após a indução do modelo experimental de ELT, as ratas dos grupos experimentais foram alocadas individualmente em caixas transparentes e levadas à sala de videomonitoração. Neste ambiente as fêmeas foram monitoradas quanto à presença de CERs 24 horas por dia, durante os 12 meses seguintes por meio do equipamento de videomonitoração da marca Intelbrás, modelo VD 16E 480C.

A gravação das fêmeas dos 6 grupos experimentais foram realizadas 24 horas/dia, de forma que a atividade motora pudesse ser analisada tanto no seu período de maior atividade (noturno), como no de menor atividade (diurno). As gravações noturnas foram possíveis devido à luz infravermelha presente nas câmeras, o que possibilita a observação do animal em um ambiente sem iluminação. As gravações obtidas foram assistidas na velocidade rápida de reprodução (velocidade comumente utilizada para a identificação das crises) a partir do equipamento de gravação. Devido à capacidade limitada de armazenamento de dados do equipamento e o mesmo descartar as gravações automaticamente após atingido seu limite, as filmagens foram armazenadas em discos rígidos e assistidas em um computador convencional. Para a reprodução destas filmagens foi adquirido o software do equipamento de filmagem, gratuito e disponível no sítio de internet da empresa.

A identificação das crises comportamentais a partir das gravações foi realizada com base nos estádios 1-5 descritos por Racine (1972) e Pinel e Rovner (1978a e 1978b). Racine (1972) classificou os comportamentos expressos pelas crises da seguinte forma: estágio 1: automatismos orofaciais; estágio 2: estágio 1 acrescido de movimentos mastigatórios; estágio 3: estágio 2 acrescido de clonias das patas anteriores; estágio 4: estágio 3 acrescido de *rearing* (postura em que o animal se encontra sobre 2 apoios acompanhado de movimentos das patas anteriores) e; estágio 5: estágio 4 acrescido de perda postural e queda. Pinel e Rovner (1978a e 1978b) consideraram os 5 itens propostos por Racine (1972) e adicionaram outros 3, os quais foram chamados de classes motoras de crises, são estes: crise motora classe 6, crise caracterizada pela ocorrência de no mínimo dois *rearings* e duas perdas de equilíbrio seguido por queda, ou seja, 2 crises estágio 5 consecutivas, conforme classifica Racine (1972); crise motora classe 7, ocorrência de crise motora classe 6 seguido por pular e correr em círculos e; crise motora classe 8, a ocorrência da crise motora classe 7 acompanhada por períodos de tónus.

4.7 Parâmetros analisados

Os parâmetros estudados foram: 1- desenvolvimento ou não de SE após o tratamento com Pilo; 2- latência para o SE; 3- mortalidade durante o período de SE; 4- acompanhamento da regularidade do ciclo estral nas fêmeas não ovariectomizadas (SE e SSE); 5- frequência de crises durante a fase crônica do modelo de ELT nas fêmeas dos grupos SE, SEOVX e OVXSE; 6- identificação e frequência de possíveis crises nas fêmeas dos grupos SSE, SSEOVX e OVXSSE; e, 7- descrição de outros padrões comportamentais nos seis grupos experimentais.

4.8 Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizada estatística descritiva, as variáveis foram expressas sob a forma de média $\pm$ desvio do erro. Foi considerado um intervalo de confiança de 95% e os resultados considerados significantes quando $p \leq 0,05$ ($\alpha \leq 5\%$).

Foi utilizado o teste *Kolmogorov-Smirnov* para identificar a distribuição normal ou não dos dados e o Teste de *Levene* para análise da homogeneidade dos dados. A seguir foi utilizado o teste T Student para a comparação da Latência para o SE para as fêmeas NOVX e ovariectomizadas (OVX). Já para a latência para a primeira alteração motora foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. As análises foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Software Prism 4.0*, San Diego, USA.

A mortalidade por crise tônica e a mortalidade durante o SE foi analisado por meio do teste *Q-quadrado*. A análise intra-grupo e entre grupos entre as fêmeas SSE, SSEOVX e OVXSSE e entre as fêmeas SE, SEOVX e OVXSE foi realizada por meio do teste *Kruskal Wallis*.

Resultados

V. RESULTADOS

Dentre as 86 fêmeas NOVX injetadas no dia de estro do ciclo estral, 40 (47%) não desenvolveram SE (SSE), 30 (34%) apresentaram SE e 16 (19%) foram a óbito após apresentarem crise tônica (Figura 5). Dentre as demais 48 fêmeas previamente ovariectomizadas e após 6 dias injetadas, 22 (46%) não desenvolveram SE (OVXSSE), 16 (33%) apresentaram SE (OVXSE) e 10 (21%) foram a óbito. O teste Q-quadrado demonstrou que não houve diferença entre as fêmeas NOVX e OVX quanto à presença de SE, $p=0,852$.

Outras 3 fêmeas com ciclo estral regular constituíram o grupo CTL o qual serviu de comparação com os grupos experimentais na análise do ciclo estral.

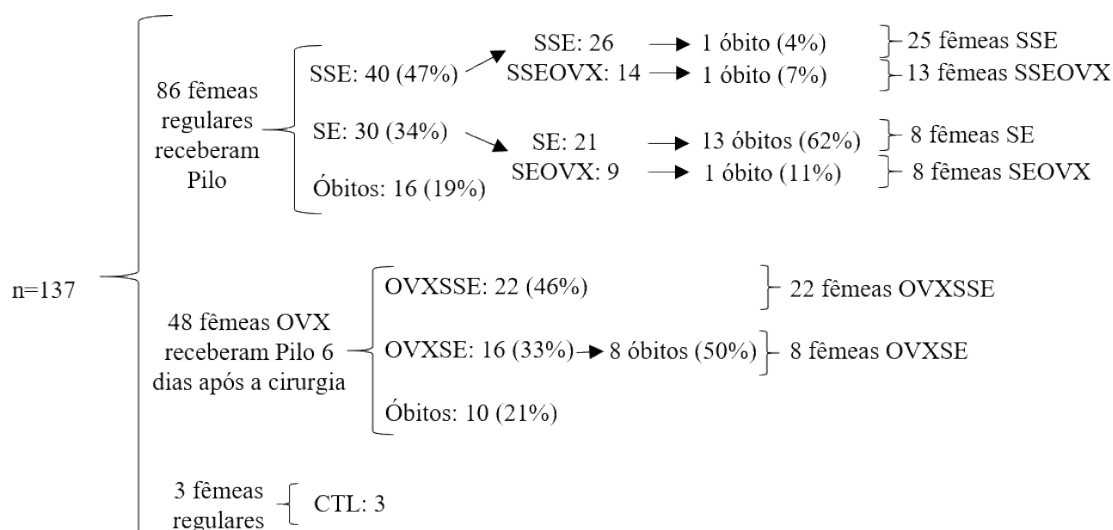


Figura 5. Distribuição de animais e procedimentos. Sem *Status Epilepticus* (SSE), Sem *Status Epilepticus* Ovariectomizada (SSEOVX), com *Status Epilepticus* (SE), com *Status Epilepticus* Ovariectomizada (SEOVX Ovariectomizada Sem *Status Epilepticus* (OVXSSE), Ovariectomizada com *Status Epilepticus* (OVXSE) e controle (CTL).

5.1 Avaliação Comportamental após a indução do modelo de Epilepsia do Lobo Temporal pela Pilo

Os comportamentos iniciais das fêmeas que apresentaram SE após receberem a Pilo se caracterizaram por quietude, movimentos orofaciais,

salivação, cauda em riste, tremores da cabeça acompanhados ou não por tremores do restante do corpo e movimentos bruscos do pescoço em extensão com a fêmea sobre 2 e 4 apoios. Estes comportamentos se repetiram inúmeras vezes até o animal atingir o SE. O quadro comportamental das fêmeas OVX foi mais agressivo do que aquele observado nas fêmeas NOVX, os quais se traduziram por movimentos orofaciais, *rearing*, crises tônico-clônicas (CTC) e crises tônicas (CT).

5.1.1 Latência para a primeira alteração motora após a injeção de Pilo

As primeiras alterações motoras após a injeção da droga foram observadas nas fêmeas NOVX dentro um Intervalo de Confiança (IC) (95%) de 4,38-14,52 min. e média e desvio do erro ($X \pm DE$) ($9,45 \pm 2,27$ min.). Nas fêmeas OVX a latência para a primeira alteração motora ocorreu dentro de um IC (95%) de 12,71-19,96 min. e $X \pm DE$ ($16,33 \pm 2,27$ min.). Ao teste não-paramétrico *Mann-Whitney* foi obtido $U:21$ e $p=0,0328$, o que indica que houve diferença estatística entre o grupo NOVX e OVX, com menor tempo para a ocorrência da primeira alteração motora nas fêmeas NOVX (Gráfico 1).

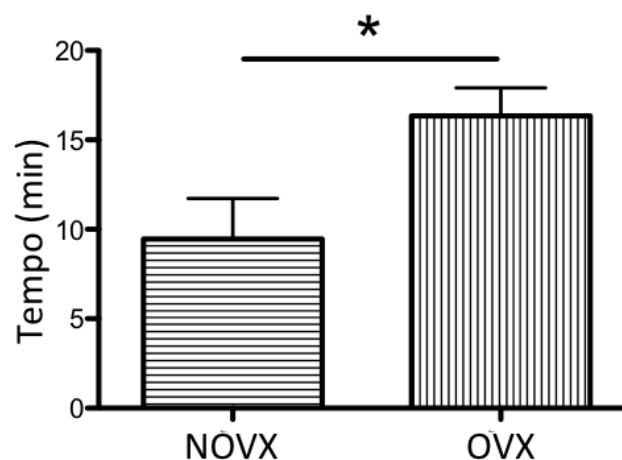


Gráfico 1. Latência para a primeira alteração motora após a injeção de Pilo, grupo NOVX IC (95%): 4,38-14,52 min. e média e DE ($9,45 \pm 2,27$ min.) e OVX IC (95%): 12,71-19,96 min. e $X \pm DE$ ($16,33 \pm 2,27$ min), $U:21$ e $p=0,0328$. As barras no gráfico representam a média e desvio do erro, foi aplicado o Teste *Mann-Whitney*. NOVX: não ovariectomizada; OVX: ovariectomizada.

5.1.2 Latência para a ocorrência de SE

Os comportamentos caracterizados por crises límbicas observados nas fêmeas NOVX e OVX após a injeção da Pilo se repetiram a cada 3-8 min. até atingirem o SE. Para análise da latência para o SE foi utilizado o Teste paramétrico *t Student*, onde foi obtido $t=2,324$, $gl=13$ e $p=0,0369$. Os dados obtidos nas fêmeas do grupo NOVX indicou $X \pm DE$ $23,43 \pm 1,23$ min. e IC (95%) de 20,41-26,44 min. Nas fêmeas OVX os valores de $X \pm DE$ obtidos foram $28 \pm 1,48$ min. e IC (95%) de 24,48-31,52 min. Estes resultados indicam que houve diferença significativa no tempo decorrido para a ocorrência de SE entre ambos grupos, com menor tempo dispendido pelo grupo NOVX (Gráfico 2).

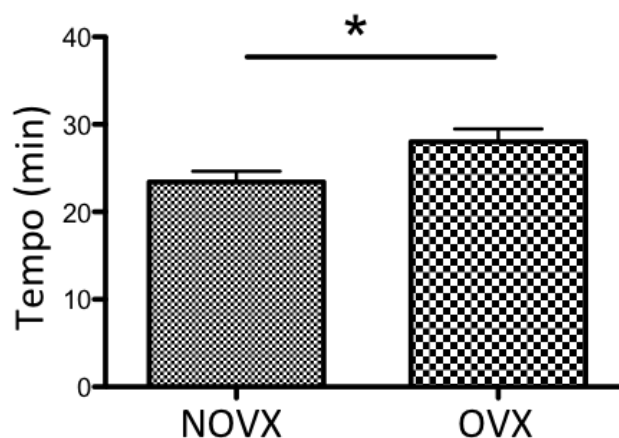


Gráfico 2. Latência para o SE após a injeção de 360mg/Kg de Pilo em fêmeas NOVX $X \pm DE$ $23,43 \pm 1,23$ min. e IC (95%) de 20,41-26,44 min e OVX $X \pm DE$ $28 \pm 1,48$ min. e IC (95%) de 24,48-31,52 min., $p=0,0369$. As barras no gráfico representam a $X \pm DE$, foi aplicado o Teste *T Student*. NOVX: não ovariectomizada; OVX: ovariectomizada.

5.2 Mortalidade por crise tônica após a Pilo

Quanto à mortalidade observada nas fêmeas dos grupos NOVX e OVX por crise tônica após receberam a Pilo, foi observado que as fêmeas OVX apresentaram porcentual de 21% (10/48) e as fêmeas NOVX de 18,6% (16/86). A análise destes resultados por meio do teste Q-quadrado demonstrou que não

houve diferença entre os grupos, não podendo ser feita associação entre a ocorrência de CT e a ausência dos hormônios ovarianos nestas fêmeas. Foi obtido $p=0,754$.

5.3 Mortalidade durante o SE

Para a análise da mortalidade das fêmeas NOVX e OVX durante o SE foram considerados os óbitos ocorridos até 48h após a injeção da Pilo. A mortalidade no grupo NOVX foi de 52% (11/21) e no grupo OVX, 50% (8/16). Os resultados obtidos foram analisados por meio do teste Q-quadrado o qual demonstrou que não houve diferença entre os grupos. O valor obtido foi de $p=0,883$, o que indica que não há associação entre a mortalidade dos animais injetados e a ausência dos hormônios sexuais femininos.

5.4 Alterações quanto à regularidade do Ciclo Estral

Foi verificado que as fêmeas OVX (SSEOVX, OVXSSE e OVXSE) apresentaram a fase de diestro permanente ao longo de toda a sobrevivência (12 meses), bem como as fêmeas SEOVX do 1º-4ºmpp, tal como esperado para os grupos castrados.

Quanto aos animais dos grupos NOVX, 18 fêmeas SSE tiveram seus registros realizados até o 8ºmpp e 14 até o 12ºmpp. Dentre as fêmeas SE, 6 foram acompanhadas entre 1-4mpp, 4 entre 5-8mpp e 3 entre 9-12mpp. Três fêmeas pertencentes ao grupo controle foram acompanhadas por 12 meses.

No período entre 1-4mpp, 67% ($n=12$) das fêmeas SSE mantiveram o ciclo estral regular até o 3ºmpp e 33% ($n=6$) estavam irregulares neste período. Entre 5-8mpp, 89% das fêmeas ($n=16$) apresentaram ciclo irregular e em 11% ($n=2$) foi identificado a presença de estro constante. Quanto ao período entre 9-

12mpp, 64% (n=9) estavam irregulares e 36% (n=5) apresentaram estro constante.

No grupo SE foi observado entre 1-4mpp regularidade em 17% (n=1) e irregularidade do ciclo estral em 83% (n=5). Entre 5-8mpp e 9-12mpp, todas as fêmeas deste grupo apresentaram ciclo estral irregular, n=4 e n=3, respectivamente.

Também foram identificadas alterações do ciclo estral nas 3 fêmeas do grupo CTL. No período 1-4 meses após receber a injeção de salina ip., 33% (n=1) se manteve regular, enquanto 67% (n=2) se mantiveram regular até o 3º mês pós salina. Nos períodos entre 5-8 e 9-12 meses após receberam a salina, estes animais apresentaram estro constante (Tabela 2).

Tabela 2. Dados do ciclo estral dos grupos SSE, SE e CTL ao longo de 12 meses após receberem a Pilo ou Salina

Períodos de coleta/ Grupos	1-4 meses	5-8 meses	9-12 meses
SSE	n=18 67% regular até 3ºmpp 33% irregular	n=18 89% irregular 11% estro constante	n=14 64% irregular 36% estro constante
SE	n=6 17% regular 83% irregular	n=4 100% irregular	n=3 100% irregular
CTL	n=3 67% regular até 3ºmpp 33% irregular	n=3 100% estro constante	n=3 100% estro constante

mpp: meses pós-pilo; SSE: sem *status epilepticus*; SE: com *status epilepticus*; CTL: controle

5.5 Videomonitoração dos Grupos Experimentais em Períodos de até 12 e 16 meses de observação

Devido a limitação do espaço na sala de filmagem e a necessidade de seu uso por outros pesquisadores, parte das fêmeas injetadas com Pilo foram

videomonitoradas. Os resultados obtidos foram analisados a partir de 4 janelas de observação ao longo dos 16 meses de estudo. Com exceção às fêmeas SSE, cuja videomonitoração foi assistida até o 16ºmpp e SEOVX assistido até o 4ºmpp, os demais 4 grupos foram assistidos até o 12ºmpp (Tabela 3).

Foram videomonitoradas, 18 de 25 fêmeas que constituíram o grupo SSE, 11 de 13 do grupo SSEOVX, 6 de 22 fêmeas OVXSSE, todas as 8 fêmeas do grupo SE, 3 das 8 ratas SEOVX e 4 das 8 fêmeas do grupo OVXSE (Tabela 3).

Tabela 3. Número de fêmeas dos grupos SSE, SSEOVX, OVXSSE, SE, SEOVX, OVXSE videomonitoradas ao longo de 16 meses

Períodos (mpp)/ Grupos	1-4	5-8	9-12	13-16
SSE	8	6	15	3
SSEOVX	9	11	6	
OVXSSE	3	2	1	
SE	8	4	1	
SEOVX	3			
OVXSE	4	3	2	

mpp: meses pós-pilo; SSE: sem *status epilepticus*; SSEOVX: sem *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSSE: ovariectomizada sem *status epilepticus*; SE: *status epilepticus*; SEOVX: *status epilepticus* ovariectomizada; e, OVXSE ovariectomizada *status epilepticus*

Foram assistidas 3500 horas de filmagem, cerca de 580h/grupo. A partir destas foram observadas as alterações motoras, que uma vez identificadas, tiveram a filmagem selecionada, editada e armazenada em pequenos vídeos com duração média entre 20s - 5min.

Foram adquiridos 590 vídeos ao término da gravação e seleção das alterações destas fêmeas (194 do grupo SE; 32 do grupo SEOVX; 261 do grupo

OVXSE; 41 do grupo SSE; 21 do grupo SSEOVX e 41 vídeos do grupo OVXSSE).

5.5.1 Velocidade de gravação e observação de alterações motoras

Durante a reprodução dos vídeos armazenados foi observado que o uso do software da empresa Intelbrás, quando instalado em um computador convencional, apresentava velocidade de reprodução mais lenta do que aquele fornecido pela empresa e instalado na sala de videomonitoração da Disciplina de Neurociências.

A partir desta diferença de velocidade foi notado que algumas alterações motoras eram possíveis de serem observadas apenas quando a gravação era reproduzida na velocidade real, ou seja, em que o movimento do animal é realizado. Em análise mais detalhada, foi notado que a duração destas alterações variavam de 5-20 segundos em sua maioria, e, portanto, imperceptíveis quando analisadas na velocidade rápida de reprodução, gerando a falsa impressão de que não existiam.

Visto que possivelmente as alterações motoras poderiam estar sendo ignoradas, optou-se por selecionar aleatoriamente algumas fêmeas dos grupos SSE (n=9), SSEOVX (n=3) e OVXSSE (n=4) e assistir as suas gravações na velocidade real de reprodução. Esta estratégia aumentou substancialmente o tempo para a análise das filmagens, que até o momento dispendiam cerca de 2 horas de trabalho para cada 24h de gravação. A partir de então, foi necessário 1 hora de trabalho para cada 10min de gravação.

Em função disto, foi optado por serem assistidas 12h de gravação, de 4 dias distintos (3h de cada dia). O período noturno (entre 19-7h) foi escolhido visto ter sido observado que as alterações motoras das ratas SSE, SSEOVX e

OVXSSE (diferentemente das fêmeas SE, SEOVX e OVXSE), se faziam presentes durante a realização de um movimento rotineiro do animal, como andar ou explorar o ambiente, o que ocorria com maior frequência no período noturno, quando o animal se encontrava mais ativo.

Esta ação foi primordial para a detecção das alterações motoras nestes animais e para os resultados deste trabalho, evitando a ocorrência de achados falso negativos. Todos os comportamentos identificados foram cuidadosa e repetidamente analisados, visto que as fêmeas dos grupos SSE, SEOVX e OVXSSE apresentaram movimentos até então desconhecidos pelos pesquisadores e que poderiam ser sugestivos de uma atividade com origem em um foco epileptogênico. Atenção especial foi dada à análise dos movimentos observados, visto serem de curta duração e realizados, na maioria das vezes, em uma sequência de 2-5 movimentos, o que adicionava maior dificuldade em sua compreensão. Além disto, a localização da gaiola de alguns animais em relação à da câmera de filmagem, também acrescentou certo grau de dificuldade e solicitou maior atenção às análises realizadas.

Dentre os achados identificados estavam ações que poderiam ser facilmente confundidas com movimentos normais do animal, como por exemplo, na situação em que a fêmea se encontra em pé, apoiada sobre as patas traseiras e pescoço em extensão. Esta postura é comum ao animal ao farejar o ambiente, uma de suas estratégias de exploração, entretanto, foi observado que a mesma ocorreu inúmeras vezes antecederida por um movimento forte e rápido (súbito) de extensão do pescoço e tronco, o qual conduzia o animal da posição de 4 para 2 apoios. Em outras situações, a partir da mesma, o animal apresentava movimentos repetitivos e de pequena amplitude em extensão do pescoço, ou ainda, cerca de 2-3 movimentos de hiperextensão do pescoço.

Em função disto, outras três fêmeas controle foram videomonitoradas por 24h durante 3 dias, com o intuito de diferenciar os comportamentos anômalos daqueles considerados habituais à rata, e assim, descartar a possibilidade das alterações observadas serem comportamentos normais de animais não injetados. Estas fêmeas foram escolhidas aleatoriamente, apresentavam idade entre 4-5 meses, não receberam Pilo e não participaram de outro experimento. Após a videomonitoração estes animais foram disponibilizadas ao biotério da Disciplina para uso experimental. Foram assistidas 12h de gravação noturnas, de 3 noites diferentes, 4h/noite. Os comportamentos foram observados e comparados àqueles obtidos pelas fêmeas que receberam Pilo.

À comparação entre as fêmeas controle e dos grupos SSE, SSEOVX e OVXSSE foi constatado que, realmente, inúmeras ações observadas, consideradas anômalas e diferenciadas pertenciam, exclusivamente, aos animais experimentais (SSE, SSEOVX, OVXSSE, SE, SEOVX e OVXSE). Em função da diversidade de ações identificadas na velocidade real, e de forma a facilitar sua definição e futura observação por outros pesquisadores, as mesmas foram agrupadas e classificadas.

Assim, a partir deste trabalho é sugerida uma nova classificação, voltada à fêmeas submetidas ao modelo experimental da Pilo e que apresentaram ou não SE. Esta classificação foi denominada FeBAP (**F**emale **B**ehaviors **A**fter **P**ilo), a qual é composta por uma classificação dos movimentos e outra, dos comportamentos observados nestes animais.

A Classificação dos 4 Movimentos ou, Classificação dos 4Ms, descreve movimentos (ou ausência destes) os quais até o momento não foram sugeridos nas classificações existentes para animais injetados com a Pilo (Tabela 4).

Tabela 4. Classificação dos 4Ms, quanto aos movimentos ou a ausência destes identificados em fêmeas SSE, SSEO VX, OVXSSE, SE, SEO VX e OVXSE.

Classificação	Abreviação	Descrição do movimento
Movimentos Rítmicos da Cabeça	MRC	balanço látero-lateral, oscilação ântero-posterior e oscilação em flexão-extensão
Movimentos Súbitos da Cabeça	MSC	versão, chacaolhar, flexão, flexão-extensão, (hiper)extensão seguido ou não por relaxamento súbito da musculatura dorsal e queda sobre 4 apoios, projeção e/ou retração da cabeça
Movimentos Corporais Globais	MCG	abalo corporal, andar rapidamente em círculos, giro de 90-360° no próprio eixo e desequilíbrio
Imobilidade	IMB	ato de ficar parado (imóvel) com os olhos abertos

As ações descritas na Classificação dos 4Ms foram identificadas nas fêmeas SSE, SSEO VX e OVXSSE de forma isolada, associada a outros movimentos e também, acompanhada por ações muito similares àquelas descritas por Racine (1972). Os 4Ms também foram observados nas fêmeas SE, SEO VX e OVXSE, sob a forma de um comportamento único, de dois ou mais comportamentos subsequentes e acompanhados ou não por crises, tal como as descritas por Racine (1972).

A Classificação dos 6Bs (“B” da palavra em inglês, *behavior*, a qual significa, comportamento) foi elaborada visando facilitar a compreensão e identificação dos comportamentos observados nas fêmeas dos 6 grupos experimentais, e faz assim referência aos 6 diferentes tipos de comportamentos observados nestes grupos (Tabela 5).

Tabela 5. Classificação dos 6Bs quanto aos comportamentos observados nos grupos experimentais (SSE, SSEOVX, OVXSSE, SE, SEOVX e OVXSE)

Classificação	Classificação em Inglês	Descrição do comportamento
Crise	Seizure Behavior	Ocorrência de uma crise tal como descrito por Racine (1972)
Crise 4M	4M Seizure Behavior	Ocorrência de uma crise acrescida por um ou mais ações descritas na Classificação dos 4Ms.
Crise Sugestiva	Seizure Like Behavior	Ocorrência de uma ação similar àquelas descritas por Racine (1972).
Crise Sugestiva 4M	4M Seizure Like Behavior	Quadro de crise sugestiva acompanhada por uma ou mais ações descritas na Classificação dos 4Ms.
4M Único	4M Single Behavior	Ocorrência de uma única ação (isolada) descrita na Classificação dos 4Ms.
4M Complexo	4M Plus Behavior	Duas ou mais ações subsequentes e descritas na Classificação dos 4Ms.

5.5.2 Videomonitoração dos Grupos SSE, SSEOVX e OVXSSE

As fêmeas do grupo SSE foram videomonitoradas por 16 meses e as dos grupos SSEOVX e OVXSSE por 12 meses após receberem a Pilo. Não foram observadas quaisquer alterações motoras nestes grupos quando a análise foi realizada na velocidade rápida. Contudo, ao serem observadas na velocidade real, foram identificadas ações como piscamento, mastigação e clonia das patas, similares àquelas observadas nos estádios 1-3 de Racine (1972). Além destes, foram identificadas outras ações diferente das descritas na literatura até o momento.

Quanto às fêmeas SSE, 9/18 foram analisadas na velocidade real e apresentaram alterações motoras, 3/11 das SSEOVX e, da mesma forma, 4/8 das fêmeas OVXSSE, ou seja, todas as fêmeas destes três grupos

experimentais, quando assistidas na velocidade real, apresentaram algum comportamento sugestivo de crise ou alguma ação descrita na Classificação dos 4Ms (Tabela 6).

Tabela 6. Número de fêmeas videomonitoradas e assistidas nas velocidades rápida e real, SSE (1-16 mpp), SSEOVX e OVXSSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo

Período (mpp) / Dados	SSE (n=18)				SSEOVX (n=11)			OVXSSE (n=6)		
	1-4	5-8	9-12	13-16	1-4	5-8	9-12	1-4	5-8	9-12
Nº de fêmeas videomonitoradas	8	6	15	3	9	10	6	3	2	1
Nº fêmeas com alteração/ assistidas na vel. rápida	0/5	0/4	0/13	0/1	0/7	0/8	0/4	0/1	0/0	0/1
Nº fêmeas com alteração/ assistidas na vel. real (12h)	3/3	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/0

mpp: meses pós-pilo; vel: velocidade; SSE: sem *status epilepticus*; SSEOVX: sem *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSSE: ovariectomizada sem *status epilepticus*; SE: *status epilepticus*; SEOVX: *status epilepticus* ovariectomizada; e, OVXSE ovariectomizada *status epilepticus*

Em função da opção de assistir 12 horas de gravação das fêmeas na velocidade real, não foi possível acompanhar a progressão de todos animais ao longo de 12 ou 16 meses. Quanto aos grupos SSE e OVXSSE, nenhuma fêmea foi observada em mais de um dos períodos indicados na Tabela 6, sendo assim, foi identificado se estas apresentaram ou não alterações motoras nas janelas de tempo propostas. Já no grupo SSEOVX, 2 das 3 fêmeas videomonitoradas na velocidade real, foram analisadas em cada um dos seguintes períodos 1-4 e 9-12mpp; 1-4 e 5-8mpp e, 5-8 e 9-12mpp.

As gravações mostraram que todas as fêmeas apresentaram sinais de comprometimento desde o 1º período de análise, e que os mesmos se fizeram presentes nos demais períodos de observação.

Foram identificados, nos três grupos experimentais, 4 dos 6 comportamentos descritos na Classificação dos 6Bs (Tabela 5), são estes: crise sugestiva, crise sugestiva 4M, 4M único e 4M complexo. A tabela a seguir apresenta o número de comportamentos identificados em cada grupo de acordo com esta classificação (Tabela 7).

Tabela 7. Número de comportamentos do tipo crises (sugestivas e sugestivas 4M) e comportamentos do tipo 4M (único e complexos) nas fêmeas SSE (1-16 mpp), SSEOVX e OVXSSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo

Períodos (mpp)/ Dados	SSE (n=9)				SSEOVX (n=3)			OVXSSE (n=4)	
	1-4 (n=3)	5-8 (n=2)	9-12 (n=2)	13-16 (n=2)	1-4 (n=2)	5-8 (n=2)	9-12 (n=2)	1-4 (n=2)	5-8 (n=2)
Nº de crises (sugestivas e sugestivas 4M)	8	2	6	7	3	3	2	8	5
Nº de 4M (único e complexo)	10	aus	1	5	13	6	2	14	3

O grupo OVXSSE 9-12mpp não foi analisado na velocidade real; mpp: meses pós-pilo; 4M: classificação dos 4Ms; aus: ausente; SSE: sem *status epilepticus*; SSEOVX: sem *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSSE: ovariectomizada sem *status epilepticus*; SE: *status epilepticus*; SEOVX: *status epilepticus* ovariectomizada; e, OVXSE ovariectomizada *status epilepticus*.

Foi utilizado o teste estatístico não-paramétrico *Kruskal Wallis* para análise do número de comportamentos sugestivos de crises e ações do tipo 4M intragrupos e entre os grupos SSE, SSEOVX e OVXSSE. Foi observada diferença quanto ao número de comportamentos sugestivos entre os grupos SSE e SSEOVX nos períodos 1-4 e 5-8mpp ($p=0.047$).

A descrição do estadiamento de acordo com Racine (1972), das crises sugestivas e crises sugestivas 4M, bem como a indicação das ações 4M que acompanharam as mesmas, são indicadas a seguir (Tabela 8).

Tabela 8. Estadiamento e número de comportamentos do tipo crises sugestivas e crises sugestivas 4M nas fêmeas SSE (1-16 mpp), SSEOVX e OVXSSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo

Grupos	Período (mpp)	Estadiamento e nº de crises sugestivas	Estadiamento e nº de crises sugestivas 4M	4Ms associado à crises sugestivas
SSE	1-4	estadio 2 n=2 estadio 3 n=2	estadio 2 n=1 estadio 3 n=3	MSC, MCG
	5-8	estadio 1 n=1	estadio 3 n=1	MSC, MCG
	9-12	ausente	estadio 2 n=3 estadio 3 n=3	MCG, IMB
	13-16	ausente	estadio 1 n=1 estadio 2 n=2 estadio 3 n=4	MRC, MSC, MCG
SSEOVX	1-4	estadio 3 n=2	estadio 3 n=1	MSC, MCG
	5-8	ausente	estadio 2 n=1 estadio 3 n=2	MRC, MSC
	9-12	estadio 3 n=2	ausente	ausente
OVXSSE	1-4	ausente	estadio 2 n=2 estadio 3 n=6	MSC, MCG
	5-8	estadio 2 n=1 estadio 3 n=2	estadio 2 n=1 estadio 3 n=1	MSC e IMB

O grupo OVXSSE 9-12mpp não foi analisado na velocidade real; mpp: meses pós-pilo; 4M: classificação dos 4Ms; aus: ausente; E: estadio; SSE: sem *status epilepticus*; SSEOVX: sem *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSSE: ovariectomizada sem *status epilepticus*; SE: *status epilepticus*; SEOVX: *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSE ovariectomizada *status epilepticus*; MSC: movimento súbito da cabeça; MRC: movimento rítmico da cabeça; MCG: movimento corporal global; e, IMB: imobilidade

Além dos padrões comportamentais descritos, também foram identificados outros, caracterizados pela presença dos 4Ms, os quais se apresentaram sob a forma de 4M único e complexo. O número de

comportamentos identificados em cada grupo, de acordo com o período de observação, são descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Número de comportamentos do tipo 4M único e 4M complexo nas fêmeas SSE (1-16 mpp), SSEOVX e OVXSSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo

Grupos	Períodos (mpp)	N	4M único	N	4M complexo
SSE	1-4	2	MRC, MSC	8	MSC, MCG, IMB
	5-8	aus		aus	
	9-12	aus		1	MSC
	13-16	aus		5	MRC, MSC, MCG
SSEOVX	1-4	3	MRC, MSC, IMB	10	MSC, MCG
	5-8	aus		6	MSC, MCG
	9-12	aus		2	MSC, MCG
OVXSSE	1-4	4	MSC, MCG	10	MSC, MCG, IMB
	5-8	3	MSC, MCG	aus	

O grupo OVXSSE 9-12mpp não foi analisado na velocidade real; aus: ausente; mpp: meses pós-pilo; 4M: classificação dos 4Ms; SSE: sem *status epilepticus*; SSEOVX: sem *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSSE: ovariectomizada sem *status epilepticus*; SE: *status epilepticus*; SEOVX: *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSE ovariectomizada *status epilepticus*; MSC: movimento súbito da cabeça; MRC: movimento rítmico da cabeça; MCG: movimento corporal global; e, IMB: imobilidade.

Como pôde ser observado, os animais dos três grupos experimentais (SSE, SSEOVX e OVXSSE) apresentaram ações descritas na Classificação dos 4Ms, associadas a comportamentos definidos pela Classificação dos 6Bs, os quais possivelmente indicam que estas fêmeas tenham sido afetadas pela Pilo.

Há de se destacar a complexidade de algumas ações observadas de forma repetitiva, tanto nos períodos analisados, como em um mesmo

comportamento observado, podendo, possivelmente, serem sugestivos de automatismos característicos do rato.

5.5.3 Videomonitoração dos Grupos SE, SEOVX e OVXSE

Todas as fêmeas dos grupos SE (n=8), SEOVX (n=3) e OVXSE (n=4) foram videomonitoradas e se tornaram epiléticas. Os animais SE e OVXSE foram assistidos na velocidade rápida até o 12mpp e aqueles SEOVX (n=3) foram assistidos apenas na velocidade real por 12 horas, no período 1-4mpp. As fêmeas dos grupos SE e OVXSE são as mesmas ao longo dos períodos de análise (Tabela 10).

Tabela 10. Número de fêmeas videomonitoradas nas velocidades rápida e real, SE (1-12 mpp), SEOVX (1-4 mpp) e OVXSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo

Período (mpp)/ Dados	SE (n=8)			SEOVX (n=3)		OVXSE (n=4)		
	1-4	5-8	9-12	1-4		1-4	5-8	9-12
nº de fêmeas videomonitoradas	8	4	1	3		4	3	2
fêmeas com alteração/ assistidas na velocidade rápida	8/8	4/4	1/1	aus		4/4	3/3	2/2
fêmeas com alteração/ assistidas na velocidade real (12h)	aus	aus	aus	3/3		aus	aus	aus

mpp: meses pós-pilo; aus: ausente; SSE: sem *status epilepticus*; SSEOVX: sem *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSSE: ovariectomizada sem *status epilepticus*; SE: *status epilepticus*; SEOVX: *status epilepticus* ovariectomizada; e, OVXSE ovariectomizada *status epilepticus*.

A primeira CE foi observada entre o 1º e o 2º meses após a indução ao modelo. O número de crises apresentadas pelas fêmeas de cada grupo, de acordo com o estadiamento de Racine (1972), e o período de observação em que as mesmas foram identificadas são descritos a seguir (Tabela 11). Além das

crises, estas fêmeas também apresentaram comportamentos do tipo 4M único e 4M complexo, tal como observado nas fêmeas SSE, SEOVX e OVXSSE. Estes comportamentos foram quantificados e estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Número e percentual de crises (e crises 4M) e comportamentos 4M único e complexo nas fêmeas SE (1-12 mpp), SEOVX (1-4mpp) e OVXSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo

Período (mpp)/ Dados	SE (n=8)			SEOVX (n=3)		OVXSE (n=4)	
	1-4 n=8	5-8 n=4	9-12 n=1	1-4 n=3	1-4 n=4	5-8 n=3	9-12 n=2
Nº de crises (e crises 4M) (%)	132 (98,5)	148 (97)	14 (100)	7 (25)	47 (92)	129 (92)	60 (100)
Nº de comportamentos 4M único e complexo (%)	2 (1,5)	5 (3)	ausente	21 (75)	4 (8)	5 (4)	ausente

mpp: meses pós-pilo; 4M: classificação dos 4Ms; SSE: sem *status epilepticus*; SEOVX: sem *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSSE: ovariectomizada sem *status epilepticus*; SE: *status epilepticus*; SEOVX: *status epilepticus* ovariectomizada; e, OVXSE ovariectomizada *status epilepticus*.

Foi utilizado o teste estatístico não-paramétrico *Kruskal Wallis* para análise do número de comportamentos sugestivos de crises e ações do tipo 4M intragrupos e entre os grupos SE, SEOVX e OVXSE. Não foi observada diferença significativa entre os grupos analisados nos períodos 1-4, 5-8 e 9-12mpp.

Como apontado na tabela acima, a maior parte dos comportamentos observados nas fêmeas SE e OVXSE (analisadas na velocidade rápida) foram identificados sob a forma de crises, enquanto, nas fêmeas SEOVX (analisadas na velocidade real) foram identificados sob a forma de 4M único e 4M complexo.

A maior parte das crises destas fêmeas se caracterizaram por apresentar estadio 5. Entretanto, foi notado que a classificação de crises motoras de Pinel

e Rovner (1978a e 1978b), composta por 8 classes (pg 63), era mais adequada e permitia classificar mais precisamente as crises identificadas. Interessantemente, as fêmeas dos três grupos experimentais SE, SEOVX e OVXSE apresentaram as crises classes 6-7 de Pinel e Rovner. O número de crises identificadas ao longo de sua sobrevivência e outras características observadas são descritas a seguir (Tabela 12).

Tabela 12. Número e porcentagem de crises estágio 5 e classes 6-7 nas fêmeas SE (1-12 mpp), SEOVX (1-4 mpp) e OVXSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo

Período (mpp)/ Dados	SE (n=8)			SEOVX (n=3)		OVXSE (n=4)		
	1-4 n=8	5-8 n=4	9-12 n=1	1-4 n=3		1-4 n=4	5-8 n=3	9-12 n=2
Nº de crises estágio 5 (%) / (% fêmeas)	110 (83) / (100)	59 (40) / (100)	1 (7) / (1-100)	2 (29) / (66)		26 (55) / (100)	106 (82) / (100)	36 (60) / (100)
Nº de crises classe 6 (%) / (% fêmeas)	60 (55) / (100)	44 (75) / (100)	aus	1 (50) / (33)		7 (27) / (25)	7 (7) / (66)	23 (64) / (100)
Média do nº de quedas (min-máx)	4,5 (2-12)	7 (2-9)	aus	3,5 (2-5)		4 (2-7)	5 (2-17)	5 (2-9)
Nº de crises classe 7 (%) / (% fêmeas)	1 (1) / (12,5)	2 (3,4) / (50)	aus	aus		aus	4 (4) / (33)	7 (19) / (50)

mpp: meses pós-pilo; aus: ausente; SSE: sem *status epilepticus*; SSEOVS: sem *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSSE: ovariectomizada sem *status epilepticus*; SE: *status epilepticus*; SEOVS: *status epilepticus* ovariectomizada; e, OVXSE ovariectomizada *status epilepticus*.

Além das crises anteriormente descritas, comportamentos do tipo 4M também foram observados durante a ocorrência dos estágios 4-5 de Racine. A tabela a

seguir apresenta o número de crises e crises 4M observadas nas fêmeas SE, SEOVX e OVXSE e as ações 4M associadas à estas (Tabela 13).

Tabela 13. Número e porcentual de crises e crises 4M identificadas nas fêmeas SE (1-12 mpp), SEOVX (1-4 mpp) e OVXSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo

Grupos	Períodos (mpp)	Nº de crises (%) / crises 4M (%)	Ações 4Ms associadas à crises
SE (n=8)	1-4	n=127 (96) / n=5 (4)	MCG
	5-8	n=46 (31) / n=102 (69)	MSC, IMB
	9-12	n=0 (0) / n=14 (100)	MSC, MCG, IMB
SEOVX (n=3)	1-4	n=0 (0) / n=5 (100)	MCG, IMB
OVXSE (n=4)	1-4	n=44 (94) / n=3 (6)	IMB
	5-8	n=121 (94) / n=8 (6)	IMB
	9-12	n=31 (100) / n=0 (0)	ausente

mpp: meses pós-pilo; 4M: classificação dos 4Ms; SSE: sem *status epilepticus*; SSEOVX: sem *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSSE: ovariectomizada sem *status epilepticus*; SE: *status epilepticus*; SEOVX: *status epilepticus* ovariectomizada; e, OVXSE ovariectomizada *status epilepticus*.

A imobilidade, um dos itens da classificação dos 4Ms, foi outra interessante e frequente ação observada nas fêmeas SE, SEOVX e OVXSE (bem com nas fêmeas SSE, SSEOVX e OVXSSE). Este comportamento se fez presente principalmente durante a ocorrência de crises, sendo mais frequentemente observado durante os estádios 4-5, entretanto, também observado durante o comportamento do tipo 4M complexo. A tabela a seguir

apresenta o tempo de imobilidade associado aos estadios ou comportamentos 4M complexo apresentados ao longo da sobrevida destes grupos (Tabela 14).

Tabela 14. Tempo de imobilidade associado à crises e comportamentos 4M complexo nas fêmeas SE (1-12 mpp), SEOVX (1-4 mpp) e OVXSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo

Grupos	Períodos (mpp)	Tempo de imobilidade	Estadiamento e nº de crises ou comportamento 4M complexo (% de fêmeas afetadas)
SE n=8	1-4 n=8	10'	estadio 5 n=1 (12,5)
	5-8 n=4	2-4' 1-8' 37"-15'	estadio 3 n=3 (50) estadio 4 n=6 (75) estadio 5 n=15 (75)
	9-12 n=1	40"-2' 2,5-5'	estadio 3 n=3 (100) estadio 4 n=2 (100)
SEOVX n=3	1-4 n=3	35" e 5'	estadio 5 n=2 (33)
OVXSE n=4	1-4 n=4	1'20" 21-24'	4M complexo n=1 (25) estadio 5 n=2 (25)
	5-8 n=3	2' 6' 13'	4M complexo n=1 (33) estadio 4 n=1 (33) estadio 5 n=1 (33)
	9-12 n=2	ausente	ausente

mpp: meses pós-pilo; 4M: classificação dos 4Ms; SSE: sem *status epilepticus*; SSEOVX: sem *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSSE: ovariectomizada sem *status epilepticus*; SE: *status epilepticus*; SEOVX: *status epilepticus* ovariectomizada; e, OVXSE ovariectomizada *status epilepticus*.

Quanto aos comportamentos do tipo 4M único e complexo, os quais não foram até o momento descritos na literatura, representaram entre 1,5-8% do total de eventos identificados nas fêmeas analisadas na velocidade rápida (SE e OVXSE) e, 75% daquelas observadas na velocidade real por 12h (SEOVX) (Tabela 11). Todos os grupos experimentais apresentaram este comportamento,

exceto no período entre 9-12mpp (SE e OVXSE) o qual foi marcado pela presença exclusiva de crises, n=14 e n=60, respectivamente (Tabela 11). Na tabela a seguir são indicados o número e os comportamentos 4M único e complexo observados nas fêmeas SE, SEOVX e OVXSE (Tabela 15).

Tabela 15. Número e descrição dos comportamentos do tipo 4M único e complexo observados nas fêmeas SE (1-12 mpp), SEOVX (1-4 mpp) e OVXSE (1-12 mpp) após receberem a Pilo

Grupos	Períodos (mpp)	N	4M único	N	4M complexo
SE n=8	1-4	2	MCG	ausente	
	5-8	4	MCG	1	MCG
	9-12	ausente		ausente	
SEOVX n=3	1-4	14	MSC, MCG	7	MSC, MCG
OVXSE n=4	1-4	2	MSC, MCG	2	MSC, MCG, IMB
	5-8	3	MSC	2	MSC, MCG
	9-12	ausente		ausente	

N: número; mpp: meses pós-pilo; SSE: sem *status epilepticus*; SSEOVX: sem *status epilepticus* ovariectomizada; OVXSSE: ovariectomizada sem *status epilepticus*; SE: *status epilepticus*; SEOVX: *status epilepticus* ovariectomizada; e, OVXSE ovariectomizada *status epilepticus*.

Discussão

VI. DISCUSSÃO

Neste trabalho fêmeas NOVX e OVX foram submetidas ao modelo experimental de ELT por meio da injeção ip. de 360 mg/kg. As fêmeas injetadas foram distribuídas em 6 grupos experimentais, SSE, SSEOVX, OVXSSE, SE, SEOVX e OVXSE e acompanhadas via videomonitoração, ao longo de um ano, para a observação da ocorrência de CER.

Os comportamentos iniciais observados nas fêmeas NOVX se diferenciaram parcialmente daqueles descritos por Valente et al. (2002) após a injeção da Pilo. Além dos comportamentos em comum como quietude, movimentos orofaciais e salivação, neste trabalho ainda foram observados cauda em riste, tremores da cabeça acompanhados ou não por tremores do restante do corpo e movimentos bruscos do pescoço em extensão com a fêmea sobre 2 e 4 apoios. Os autores acima observaram comportamentos similares entre as fêmeas NOVX e OVX, entretanto, neste trabalho o quadro comportamental das fêmeas OVX foi mais agressivo do que aquele nas fêmeas NOVX, os quais se traduziram por *rearing*, CTC e CT, além de movimentos orofaciais, também observados por Valente et al. (2002). A ausência do fator protetor fornecida pelos hormônios gonadais justifica a diferença de padrões comportamentais observados nos grupos NOVX e OVX. O intervalo entre a ovariectomia e a indução ao modelo foi de 4 dias para aqueles autores e de 6 dias neste trabalho, entretanto o maior intervalo entre ambos procedimentos não parece ser o responsável pela resposta mais agressiva nas fêmeas OVX deste trabalho.

As primeiras reações observadas nas fêmeas NOVX, após a injeção da Pilo, as quais foram seguidas por crises convulsivas, ocorreram ($X \pm DE$) ($9,45 \pm$

2,27 min.), enquanto nas fêmeas OVX os mesmos se iniciaram entre $X \pm DE$ ($16,33 \pm 2,27$ min) após a administração da droga, $p=0,0328$.

A latência para o SE das fêmeas NOVX foi $23,43 \pm 1,23$ min. ($X \pm DE$) se diferiu das fêmeas OVX, a qual foi $28 \pm 1,48$ min. ($X \pm DE$), $p=0,0369$. Estes dados diferiram daqueles de Valente et al. (2002), onde as latências foram maiores em ambos os grupos e dentre estes, as fêmeas NOVX obtiveram maior latência para o SE. Os comportamentos caracterizados por crises límbicas observados nas fêmeas NOVX e OVX, após a injeção da Pilo, se repetiram a cada 3-8 min. até atingirem o SE, o que vai ao encontro dos dados de Amado e Cavalheiro (1998), os quais observaram a repetição das crises em fêmeas a cada 2-8 min.

Neste trabalho foi observado menor número de fêmeas NOVX e OVX que apresentaram SE 34% (30/86) e 33% (16/48, $p=0,852$) respectivamente, quando comparado aos resultados de Valente et al. (2002), cujo SE foi obtido em 63% das fêmeas NOVX e 68% daquelas OVX. Ao longo da elaboração dos grupos experimentais deste trabalho, o qual teve duração de dois anos, foram observados períodos com maior porcentual de fêmeas SE do que em outros, apresentando assim, variabilidade nos resultados obtidos após a aplicação da Pilo. Entretanto, apesar dos esforços, não foi possível identificar os fatores que poderiam ter influenciado esta variabilidade.

Não foi observada diferença quanto aos óbitos das fêmeas NOVX e OVX, por CT, após a injeção da Pilo (18,6%, 16/86 e 21%, 10/48, respectivamente) $p=0,754$. Os óbitos por outras causas, que não a CT até 48h após a Pilo, também não apresentaram significância, 52% para as NOVX e 50% para as OVX, $p=0,883$. Os dados de Valente et al. (2002) quanto à morte por CT para as fêmeas NOVX (17,39%) foram similares aos deste trabalho, entretanto, diferiram para as fêmeas OVX (39,29%), cujo óbito por CT foi maior.

Uma fêmea SEOVX foi a óbito durante a fase crônica, 2,5 mpp, possivelmente por morte súbita. Tal óbito não pôde ser comprovado por meio de histologia pois o tempo decorrido entre a morte do animal e a verificação do óbito impossibilitou a análise do tecido. Entretanto, dadas as circunstâncias que envolveram a morte da rata, as quais foram observadas pela videomonitoração, sugerem a morte súbita como a provável causa do óbito.

O ibuprofeno, um potente anti-inflamatório não esteroide (AINS) com efeito sobre o tecido nervoso (Lim et al., 2000), utilizado até o 5º PO nas fêmeas OVX, é outro fator que possa justificar a diferença entre os resultados observados neste trabalho e no de Valente et al. (2002). Ikonomidou-Turski et al. (1987) não encontraram qualquer sinal de proteção ao utilizarem 50 e 100 mg/kg de Ibuprofeno em ratos 45 min. antes da indução ao modelo da Pilo. Entretanto, assim como neste trabalho, Wallenstein (1987 e 1991), encontrou aumento no tempo de latência para o início das crises induzidas por penicilina e pentilenotetrazol, respectivamente, ao utilizar 30mg/kg de Ibuprofeno 1h antes da indução ao modelo em fêmeas. Neste trabalho as fêmeas OVXSSE e OVXSE receberam o tratamento com Ibuprofeno do 11º-6º dias prévios à injeção da Pilo, o que possivelmente influenciou a ocorrência de maior latência para a primeira alteração motora e para o SE, bem como a redução na mortalidade durante a Pilo e, no período silencioso após a indução ao modelo. Já as fêmeas SSEOVX e SEOVX receberam o Ibuprofeno entre o 3º-8º dias após o tratamento com o agonista colinérgico, o que pode ter auxiliado na redução da mortalidade destas fêmeas no período silencioso.

A irregularidade do ciclo estral parece ser uma característica comum às fêmeas epiléticas. No presente trabalho foi observado que a maior parte das fêmeas SE estavam irregulares desde os meses iniciais pós-Pilo, e que 100%

destas apresentaram irregularidade do 5º-12ºmpp. Amado e Cavalheiro (1998) e Vannucci Campos et al. (2017) observaram alterações no ciclo estral de fêmeas epiléticas analisadas por 45 e 30 dias, respectivamente, o qual se caracterizou pelo maior tempo de permanência em uma das fases do ciclo estral, indicando assim, irregularidade do mesmo. O mesmo foi observado em relação à maior parte das fêmeas SSE, que assim se mantiveram ao longo de todo o período experimental, o que possivelmente indica que o ciclo estral destas ratas foi afetado pela Pilo. Diferentemente do esperado ocorreu com as fêmeas CTL, as quais apresentaram um período inicial de irregularidade seguido por estro constante, observado do 5º-12º meses de experimentação. Este quadro possivelmente se apresentou pelo fato destas fêmeas terem sido mantidas em estantes fechadas no biotério, enquanto a maior parte das fêmeas SSE e todas as SE estavam na sala de videomonitoração, onde eram mantidas no mesmo ambiente que machos e, sendo assim, tinham o ciclo estral estimulado pelo odor destes animais (Scharfman et al., 2005).

Diferentemente de Navarro et al. (2009), os quais observaram CER em ratos SSE, neste trabalho foram identificadas alterações motoras sugestivas de crises, visto serem similares aos estadios descritos por Racine (1972), entretanto, não confirmadas por meio de EEG. A análise da videomonitoração na velocidade rápida não permitiu observar qualquer alteração nas fêmeas dos grupos SSE, SSEOVX e OVXSSE. Entretanto, foram verificados quadros sugestivos de crises estadios 1-3 em todas as fêmeas destes três grupos quando a análise foi realizada na velocidade real de captura e reprodução dos vídeos. Ao contrário dos autores acima, também foram observados neste trabalho movimentos até então não descritos na literatura para animais injetados com Pilo e, que foram aqui descritos utilizando a Classificação dos 4Ms e dos 6Bs

sugerida nesta tese. Interessantemente, as fêmeas SSE apresentaram entre 13-16mpp movimentos 4M com maior complexidade do que aqueles observados nos meses anteriores, acompanhado por maior número de repetições das ações realizadas e tempo de duração dos eventos apresentados, o que caracteriza a piora do quadro ao longo do tempo.

Já nos grupos SE e OVXSE, a análise da videomonitoração na velocidade rápida e do grupo SEOVX na velocidade real possibilitou a observação das crises segundo a descrição de Racine. Entretanto, a maior parte dos comportamentos observados nas fêmeas SEOVX se caracterizaram por ações 4M isoladas e complexas, o que claramente mostra que a velocidade real permite a observação de ações as quais não podem ser identificadas quando a visualização é realizada na velocidade rápida. Além disto, foram observadas crises motoras classes 6 e 7, classificadas por Pinel e Rovner (1978a e 1978b). Interessantemente, as fêmeas destes grupos também apresentaram alterações motoras tais como as observadas nas fêmeas SSE, SSEOVX e OVXSSE. Desta forma, as Classificações dos 4Ms e dos 6Bs são abrangentes para fêmeas submetidas ao modelo da Pilo e que desenvolveram ou não SE, visto que possibilita a identificação e descrição detalhada dos comportamentos expressos por estas, os quais vão além daqueles descritos pelos autores da área.

Navarro et al. (2009) relatam ter identificado crises com frequência de 0,5-1/semana, além de sua observação por meio de EEG, entretanto, o estadiamento observado não é descrito, bem como os registros de EEG não são demonstrados em seu trabalho. Da mesma forma, estes autores não relatam ter observado qualquer outra alteração motora nos animais analisados.

Scharfman et al. (2001) não observaram qualquer alteração motora em ratos SSE ao estudarem a fisiologia das células musgosas após a indução ao

modelo da Pilo e uso de Diazepam após 1h (SE e SSE). Entretanto, foi identificada perda de células do córtex entorrinal em 3 dos 6 animais SSE e marcação celular para NPY (cuja presença indica a ocorrência de crises (Lurton e Cavalheiro, 1997)), no hilo do giro dentado e, brotamento das fibras musgosas na camada molecular em 1 dos 6 animais. Apesar da ausência de atividade espontânea em apenas um animal com perda celular no hilo do giro dentado, o estímulo evocado sobre a camada molecular foi capaz de gerar a atividade em uma célula musgosa. A proposta destes autores, de observar estes animais até a ocorrência da 3ª CE, foi importante fator limitante para a observação de alterações comportamentais.

Quanto às demais alterações motoras identificadas neste trabalho, Loddenkemper e Kotagal (2005) descreveram o comportamento versivo como um movimento forçado e involuntário de virar a cabeça, resultando em uma posição mantida e não natural. Neste trabalho foram identificados movimentos da cabeça muito similares àqueles descritos como versão nos pacientes com epilepsia. Todos os grupos experimentais, exceto as fêmeas do grupo SE, apresentaram movimento sugestivo de versão da cabeça, os quais foram observados na maioria das vezes acompanhados por extensão do pescoço, além de outros movimentos.

Michael et al. (1998), com a colaboração de Racine, utilizaram o modelo do *kindling* estendido em ratos e observaram as mesmas crises motoras classes 6-8 descritos por Pinel e Rovner (1978a e 1978b). Em ambos casos, as crises estadios 1-5 são idênticas as descritas por Racine (1972). Entretanto, Michael et al. (1998) sugeriram uma classificação com 10 estágios, a partir de algumas modificações naquela publicada por Pinel e Rovner (1978a e 1978b). Ambos grupos de pesquisadores descreveram da mesma forma até o nível 6,

classificado pela presença de duas ou mais crises convulsivas acompanhadas por desequilíbrio e queda. Pinel e Rovner (1978a e 1978b) descreveram a crise motora classe 7 como a presença de pulo ou corrida e; crise motora classe 8, a ocorrência da crise motora classe 7 acompanhada por períodos de tônus. Michael et al. (1998) desmembraram a classe 7 de Pinel e Rovner (1978a e 1978b) em estágios 7 e 8, pular e correr, respectivamente. O estágio 9 (crise motora classe 8 dos outros autores) foi considerado a presença de crise tônica ou clônica associada a pular ou correr e, o estágio 10, a presença de crises discretas com comportamentos múltiplos, sendo ao menos um classificado como estágio 8.

Além da classificação acima Michael et al. (1998), ainda descreveram sete padrões comportamentais, dos quais 6, foram identificados neste trabalho, são estes: tônus da pata anterior e posterior, observados com baixa frequência neste trabalho; clônus assimétrico da pata anterior e clonia unilateral da pata posterior (observados em todos os grupos experimentais), clonia bilateral das patas posteriores; e, abalos corporais recorrentes e rigidez da cauda, os quais estão dentre os mais frequentes e observados em todos os grupos experimentais.

Três outras manifestações distintas e bastante curiosas foram identificadas em comum por Pinel e Rovner (1978a) e este trabalho: 1) o caso de um animal que apresentou o quadro de paraplegia durante a fase crônica do modelo de *kindling*. Neste trabalho uma fêmea SSEOVX aos 10mpp apresentou quadro de irresponsividade das patas traseiras com duração de 11seg. Neste, a fêmea tentava se levantar usando as patas anteriores, apoiadas contra a parede da gaiola e, claramente, era observada a ausência de ação das patas posteriores ou, o que parecia ser uma hipotonia destas; 2) tônus das patas posteriores acompanhado por deitar sobre a lateral do corpo. Neste trabalho, uma fêmea SE

apresentou no 6ºmpp, com duração de 32s, o comportamento de queda lenta sobre a lateral esquerda do corpo, a partir da posição sobre 4 apoios, seguido por movimentos com a cabeça na tentativa de recuperar a posição inicial, enquanto as patas traseiras permaneciam em extensão (tonia); e, 3) andar rapidamente em círculos com início e término súbitos, o qual foi identificado em todos os grupos experimentais;

Outros movimentos como, retração da cabeça e/ou tronco antecedido ou não por projeção da cabeça, ainda, imobilidade, contração abdominal súbita (como um soluço), balanço látero-lateral da cabeça e/ou tronco e, oscilação ântero-posterior da cabeça ou tronco, foram também identificados nas fêmeas de todos os grupos experimentais, entretanto parecem, até o momento, não terem sido descritos na literatura.

Os movimentos súbitos e rítmicos de flexão-extensão do pescoço observados em algumas fêmeas deste trabalho são muito similares às manifestações do tipo *head drops* identificadas em crianças. Estudo de Brunquell et al. (1990) tentou identificar as características clínicas e eletrofisiológicas dos *head drops* quanto à sua origem epiléptica ou não. Os autores identificaram três tipos diferentes de manifestações nos dois grupos de estudo: a) *head drop* verdadeiro, caracterizado pela queda rápida da cabeça seguida por lenta recuperação, mais observado no grupo em que as descargas ictais ocorriam durante a manifestação motora; b) *head nods*, quando a queda da cabeça e a sua recuperação apresentam a mesma velocidade, observado igualmente em ambos grupos; e, *head bobs*, os quais são *head nods* consecutivos, observados apenas no grupo de pacientes cujos *head drops* não apresentaram descargas ictais ao EEG. Quatorze anos após o trabalho de Brunquell et al. (1990), as questões relacionadas a esta manifestação motora ainda parecem ser um

problema na prática clínica infantil. Vignoli et al. (2014) descreve não haver diretrizes que auxiliem os médicos no diagnóstico diferencial destas manifestações, sendo necessária a realização de vídeo-EEG poligráfico do evento para determinação do diagnóstico.

O movimento de girar no próprio eixo foi observado nos 6 grupos experimentais e se assemelham à descrição das crises giratórias (CGs) de Dobesberger et al. (2005), que as caracteriza pelo movimento de girar (no mínimo 180°) em torno do próprio eixo. Estes autores observaram que apenas 4% dos pacientes estudados e 1% das crises apresentadas eram do tipo CGs, sendo a ELT a segunda mais presente (2%), antecedida pela Epilepsia do Lobo Frontal (ELF) (17%). Cinquenta e oito por cento das CGs observadas por aqueles autores iniciaram com versão da cabeça seguido por versão de todo o corpo, comportamentos também identificados neste trabalho. Entretanto, neste trabalho foi observado que 14-50% das fêmeas SSE, SSEOVX e OVXSSE e, 50-66% daquelas SE, SEOVX e OVXSE apresentaram movimentos sugestivos de CGs. Em uma fêmea SSE foi observado 4 episódios de movimentos do tipo CGs antecédidos por versão da cabeça.

Taylor et al. (1981) relatam que os comportamentos circulares provocados em ratos apresentam semiologia bastante similar às CGs. Estes autores observaram que a injeção de ácido caínico no corpo estriado do rato promove a ocorrência de comportamentos giratórios os quais são antecédidos por comportamentos versivos ipsilaterais e contralaterais à lesão. Vercueil et al. (1999) observaram a ocorrência de CGs ao induzirem eletricamente um paciente com ELTM anterior à ocorrência de crises. Por meio deste trabalho os autores sugeriram o envolvimento dos núcleos da base (NB) e da via nigroestriatal, com propagação para o sistema límbico, na geração das CGs.

Inúmeros trabalhos evidenciam a ação dos NB em modelos experimentais de epilepsia induzido pela Pilo e *kindling* (Clifford et al. 1987; Turski et al, 1990; Deransart et al., 1998; Yu et al., 2016). Observações realizadas durante procedimento cirúrgico em humanos e estudos em macacos, demonstraram que os NB atuam como uma estação de relé na propagação de crises (Chkhenkeli, 1978; Hayashi, 1952). A parte reticulada da substância negra (SNpr) é referida como a principal eferência dos NB, sua atividade se encontra sob ação inibitória proveniente do corpo estriado e excitatória do núcleo subtalâmico (NST) e córtex cerebral (Deransart et al., 1998). Turski et al. (1987 e 1989) demonstraram que o corpo estriado e suas eferências, as quais se finalizam na SNpr e globo pálido interno (Gpi)/ núcleo endopeduncular, são essenciais para o espalhamento e término das convulsões no prosencéfalo.

Deransart et al. (1998) estudaram o controle das crises comportamentais e eletroencefalográficas de ratos submetidos ao modelo de *kindling* por meio da injeção de um antagonista competitivo do receptor de NMDA na SNpr de ratos bilateralmente, e a ação do agonista GABAérgico muscimol sobre a SNpr, quando injetado no NST. Em ambos experimentos foi observado desaparecimento dos estadios 4 e 5 de Racine, sem alteração significativa no EEG realizado na amígdala e córtex cerebral. Estes resultados sugerem que o bloqueio glutamatérgico da SNpr e a inibição da ação excitatória do NST sobre a SNpr reduz as crises de animais submetidos ao *kindling* da amígdala, entretanto não afeta a geração de crises a partir da amígdala.

Turski et al. (1990) estudaram o efeito das drogas antiepiléticas, o benzodiazepínico (midazolan), o barbitúrico (fenobarbital) e a oxazolidinediona (trimetadiona), administradas sobre a SNpr de ratos 15 min antes da injeção ip. de Pilo 380mg/kg. Foi observada ausência de crises de origem comportamental

e eletroencefalográfica hipocampal e cortical, bem como alterações morfológicas teciduais. Além disto, a mortalidade nestes animais foi nula. Os autores acreditam que a SNpr pode ser um importante local para ação de algumas drogas antiepilépticas e para o controle das crises. Waszczak et al. (1986) observaram o mesmo efeito sobre a SNpr ao administrarem estas drogas sistemicamente, por via intravenosa.

Yu et al. (2016) observaram que a estimulação cerebral profunda sobre o globo pálido ventral (GPv) diminui a atividade epileptiforme e as crises comportamentais de animais submetidos à Pilo. Clifford et al. (1987) observaram a atividade epileptiforme do GPv em animais submetidos à Pilo previamente a atividade epileptiforme do hipocampo, o que sugere o envolvimento dos NB no modelo da Pilo.

As evidências relatadas pelos autores acima quanto à ação dos NB sobre o controle das crises nos modelos experimentais de *kindling* e da Pilo, especialmente, oferecem substrato para sugerir que os comportamentos sugestivos de crise observados nas fêmeas SSE, SSEOVX e OVXSSE tenham possível origem nestes núcleos ou, ao menos o envolvimento destes. O envolvimento dos NB no modelo da Pilo já é conhecido (Turski et al., 1990), sendo assim, é provável que algumas estruturas dos NB tenham sido comprometidas pela Pilo no momento da indução das fêmeas ao modelo experimental, ou que o mesmo tenha ocorrido previamente àquele do hipocampo, tal como no trabalho de Clifford et al. (1987). Infelizmente a lesão destes núcleos não puderam ser comprovadas por meio histológico devido a má conservação do tecido obtido. A partir desta possibilidade, é preciso refletir sobre as alterações hormonais características do ciclo estral da rata e sua influência

sobre a excitabilidade neuronal dos NB e ainda, a susceptibilidade dos mesmos à agressão causada pela Pilo.

Segundo Yacubian e Garzon (2003) as crises da ELT tendem a seguir uma sequência de eventos compostos por: aura (em 90% dos pacientes), parada e fixação do olhar, automatismos simples e alterações motoras contralaterais; e, automatismos complexos ou generalização secundária. Entretanto, tanto os automatismos, quanto as auras, são respectivamente sinais e sintomas que apresentam rica classificação e exigem atenção à sua análise. A complexidade das ações observadas nas ratas deste trabalho, cujos movimentos apresentaram, em sua maioria, uma sequência, e não apenas ações isoladas, além da variedade de alterações motoras, são características em comum às crises da ELT. O achado de Feindel e Penfiel (1954) de que os automatismos da ELT parecem ser decorrentes de descargas na região periamigdalóide e não necessariamente originadas na amígdala ou hipocampo, associado ao achado de Dobesberger et al. (2005), o qual verifica a presença de CGs em pacientes com ELT, sugerem a possibilidade de que outras estruturas ou vias neurais estejam envolvidas nesta patologia. O mesmo pode ter ocorrido quando da indução do modelo da Pilo em ratas, tornando assim compreensível os diferentes tipos de alterações motoras encontradas neste trabalho. É possível que estas alterações ainda não tenham sido descritas na literatura pois existe o hábito, entre os pesquisadores, de se analisar a videomonitoração na velocidade rápida e não a partir da velocidade de realização das ações e de captura da imagem (velocidade real).

Os automatismos das crises motoras focais da ELT são movimentos coordenados e repetitivos que se assemelham a movimentos voluntários (Yacubian e Garzon, 2003). Esta característica foi profundamente experienciada

à análise das fêmeas dos grupos SSE, SSEOVX e OVXSSE, visto que as alterações motoras somente foram identificadas após os registros serem assistidos na velocidade real e, além disto, estes precisaram ser inúmeras vezes reassistidos para que fossem diferenciados de movimentos normais do animal (prática experienciada por Brunquell et al., (1990) e Williamson et al., (1998) para detecção de crises em crianças e em paciente com ELTM, respectivamente). Os diferentes grupos experimentais ainda manifestaram comportamentos que se repetiram ao longo de sua sobrevivência e, da mesma forma, se apresentaram repetidamente em um mesmo evento manifestado, o que sugere que possam se tratar de automatismos característicos do rato.

As crises da ELT são intratáveis em 40% dos pacientes (Lanerolle e Lee, 2005). A identificação das alterações motoras, bem como o conhecimento das estruturas e vias neuronais envolvidas nestas manifestações, são importantes para o direcionamento do tratamento medicamentoso. Em função disto, esta tese propõe duas novas classificações para as manifestações motoras em ratas submetidas ao modelo da Pilo: Classificação dos 4Ms, para a grande variedade de alterações dos movimentos da cabeça e do corpo do animal ou ainda, para a ausência do mesmo; e, a Classificação dos 6Bs, para os quadros comportamentais caracterizados ou não por crises. Ambas, utilizadas conjuntamente e associadas às já existentes, proporcionarão melhor identificação e descrição das alterações apresentadas pelos animais.

Apesar da videomonitoração ter sido elemento fundamental para a identificação e descrição detalhada das várias alterações motoras observadas nos 6 grupos experimentais, sua associação ao EEG confirmaria os achados comportamentais e possivelmente o local de origem dos mesmos. Contudo, dadas as seguintes evidências: a) grande parte das alterações identificadas

foram também observadas no modelo experimental de *kindling* estendido; b) as inúmeras conexões existentes entre os NB e o sistema límbico; c) a similaridade quanto à descrição de crises identificadas e as descritas na literatura, além de elementos em comum às crises da ELT como a variedade, complexidade e repetitividade das alterações motoras, indicam que os achados desta tese, nas fêmeas SSE, SSEOVX e OVXSSE, podem se tratar de crises epiléticas parciais, possivelmente oriundas de um foco epileptogênico.

Conclusão

VII. CONCLUSÃO

Ao término deste trabalho foi possível constatar que:

- apenas 20% das fêmeas SE mantiveram regularidade do ciclo estral até o 4ºmpp e 0% destas entre 5-12mpp;

- 67% das fêmeas SSE apresentaram regularidade do ciclo estral até o 3ºmpp, a maior parte apresentou irregularidade (64-89%) (o que indica que possivelmente foram afetadas pela Pilo) e as demais (11-36%) apresentaram estro constante entre 5-12mpp;

- 67% das fêmeas CTL apresentaram regularidade do ciclo estral até o 3ºmpp e 100% apresentou estro constante entre 5-12mpp;

- a análise dos animais na velocidade real de reprodução foi crucial para a identificação de comportamentos sugestivos de crises estadio 1-3 nas fêmeas SSE, SSEO VX e OVXSSE, as quais não puderam ser visualizadas na velocidade rápida, entretanto, este procedimento aumentou substancialmente o tempo para a conclusão do trabalho;

- as fêmeas SE, SEO VX e OVXSE apresentaram crises superiores aos estadiamento de Racine (1972) e alcançaram classe 7 de Pinel e Rovner (1978a e 1978b), entretanto também apresentaram alterações motoras tais como as possivelmente observadas nas fêmeas SSE, SSEO VX e OVXSSE;

- a Classificação FeBAP, sugerida nesta tese, associada a outras existentes, auxiliará a identificação e complementará a descrição das alterações motoras de fêmeas submetidas ao modelo da Pilo que tenham ou não desenvolvido SE;

- é possível que algumas estruturas constituintes dos núcleos da base, tal como a substância negra, tenham sido afetadas pela injeção da Pilo nas

fêmeas SSE, SSEOVX e OVXSSE, sendo assim parcialmente responsáveis pelas alterações motoras observadas nas fêmeas destes grupos e;

- a semelhança das alterações motoras observadas com as crises de origem epilética, associados à variedade, complexidade e repetitividade das crises da ELT, sugere que os achados motores das fêmeas SSE, SSEOVX e OVXSSE apresentem origem em um foco epileptogênico, entretanto, mais estudos são necessários para confirmar este achado.

Referências

VIII. REFERÊNCIAS

Amado D e Cavaleiro, EA. Hormonal and gestational parameters in female rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res.* 32(1-2):266–274, 1998.

Andersen P, Soleng AF, Raastad M. The hippocampal lamella hypothesis revisited. *Brain Res.* 886(1-2): 165-71, 2000.

Ansell B, Clarke E. Epilepsy and menstruation; the role of water retention. *Lancet.* 271(6955):1232-5, 1956 in Bäckström T. Epileptic seizures in woman related to plasma estrogens and progesterone during the menstrual cycle. *Acta Neurol Scand.* 54(4), 321-347, 1976.

Babb TL, Lieb JP, Brown WJ, Pretorius J, Crandall PH. Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. *Epilepsia.* 25(6):721-8, 1984.

Babb TL. Synaptic reorganizations in human and rat hippocampal epilepsy. *Adv Neurol.* 79:763-79, 1999.

Bingel AS, Schwartz NB. Pituitary LH content and reproductive tract changes during the mouse oestrous cycle. *J Reprod Fertil.* 19(2):215-22, 1969.

Backström T. Epileptic seizures in woman related to plasma estrogens and progesterone during the menstrual cycle. *Acta Neurol Scand.* 54(4), 321-347, 1976.

Bower SPC, Kilpatrick CJ, Vogrin SJ, Morris K, Cook MJ. Degree of hippocampal atrophy is not related to a history of febrile seizures in patients with proved hippocampal sclerosis. *J Neurolsur Psychiatry.* 69(6):733-8, 2000.

Cavalheiro EA, Riche DA, Le Gal La Salle G. Long term effects of intrahippocampal kainic acid injections in rats: A method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr. Clin Neurophysiol.*; 53(6):581-589, 1982.

Cavalheiro, E.A., Leite, J.P., Bortolotto, 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*; 32(6):778-782, 1991.

Cavalheiro EA; Fernandes MJ; Turski L and M. G. Naffah-Mazzacoratti. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. *Epilepsia*, 35(1): 1-11, 1994.

Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J. Neurol, Science*. 16(1-2):33-7, 1995.

Cendes F, Sakamoto AC, Spreafico R, Bingaman W, Becker AJ. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathol*. 128(1):21-37, 2014.

Chkhenkeli, S.A., Inhibitory influences of caudate stimulation on the epileptic activity of human amygdala and hippocampus during temporal lobe epilepsy, *Izv. Akad. Nauk G.S.S.R.*, 4 406-411, 1978.

Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience*. 23(3):953–68, 1987.

Curia G , Lucchi, C, Vinet J , Gualtieri F, Marinelli C, Torsello A, Costantino L, Biagini G. Pathophysiogenesis of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? *Curr Med Chem*. 21(6):663-88, 2014.

de Lanerolle NC, Lee TS. New facets of the neuropathology and molecular profile of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy and Behav.* 7(2):190-203, 2005.

Deransart C, Lê BT, Marescaux C, Depaulis A. Role of the subthalamo-nigral input in the control of amygdala-kindled seizures in the rat. *Brain Research* 807(1-2): 78–83, 1998.

Dobesberger J, Walser G, Embacher N, Unterberger I, Luef G, Bauer G, Benke T, Barthä L, Ortler M, Trinka E. Gyrtory seizures revisited: a video-EEG study. *Neurology.* 14;64(11):1884-7, 2005.

Edwards HE, Burnham WM, Mendonca A, Bowlby DA, MacLusky NJ. Steroid hormones affect limbic afterdischarge thresholds and kindling rates in adult female rats. *Brain Res.* 838(1-2), 136-150, 1999.

Fernandes MJS, Naffah-Mazzacoratti MG, Cavaleiro EA. Na⁺K⁺ATPase in the rat hippocampus: A study in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Int.* 28(5-6): 497–500, 1996.

Fisher RS. Redefining epilepsy. *Curr Opin Neurol.* 28(2):130-5, 2015.

Fisher RS., van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 46(4):470-2, 2005.

Fisher, R.S.; Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia.* 55(4):475–482, 2014.

Funari CS, Ferro VO. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Rev Bras Farmacog.* 15(2):178-182, 2005.

Funke MG, Costa, MS, Amado D, Cavalheiro EA AND Naffah-Mazzacoratti MG. Calcium homeostasis and temporal lobe epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr.* 61 Suppl 1:8-14, 2003.

Furtado DA, Braga GK, Oliveira JAC, Del Vecchio F. Behavioral, morphologic and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia*, 43 Suppl 5, 37-9, 2002.

Hauser WA, Annegers JF, Rocca WA. Descriptive epidemiology of epilepsy contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc.* 71(6):576-86, 1996.

Harden CL, Pulver MC, Ravdin L, Jacobs AR. The effect of menopause and perimenopause on the course of epilepsy. *Epilepsia.* 40(10):1402-7, 1999.

Hayashi, T., A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application in human clinics, *Jap. J. Pharmacol.* 346-54, 1952.

Hesdorffer DC, Beck V, Begley CE, Bishop ML, Cushner-Weinstein S, Holmes GL, Shafer PO, Sirven JI, Austin JK. Research implications of the Institute of Medicine Report, *Epilepsy Across the Spectrum: Promoting Health and Understanding.* *Epilepsia.* 54(2): 207-216, 2013.

Herzog AG. A hypothesis to integrate partial seizures of temporal lobe origin and reproductive endocrine disorders. *Epilepsy Res.* 3(2):151-9, 1989.

Herzog AG. A relationship between particular reproductive endocrine disorders and the laterality of epileptiform discharges in women with epilepsy. *Neurology.* 43(10):1907-10, 1993.

Herzog AG. Progesterone therapy in women with complex partial and secondary generalized seizures. *Neurology*. 45(9):1660-2, 1995.

Herzog AG. Catamenial epilepsy: Definition, prevalence pathophysiology and treatment. *Seizure*. 17(2):151-9, 2008a.

Herzog AG. Disorders of reproduction in patients with epilepsy: primary neurological mechanisms. *Seizure*. 17(2):101-10, 2008b.

Herzog AG. Hormonal Therapies: Progesterone. *Neurotherapeutics*, 6(2):383-91, 2009.

Herzog AG, Fowler KM, Sperling MR, Liporace JD, Kalayjian LA, Heck CN, Krauss GL, Dworetzky BA, Pennell PB, and the Progesterone Trial Study Group. Variation of seizure frequency with ovulatory status of menstrual cycles. *Epilepsia*, 52(10):1843-8, 2011.

Herzog AG, Frye CA and the Progesterone Trial Study Group. Allopregnanolone levels and seizure frequency in progesterone-treated women with epilepsy. *Neurology*. 83(4), 345-8, 2014.

Herzog AG, Fowler KM, Sperling MR, Massaro, J.M. and Progesterone Trial Study Group. Distribution of seizures across the menstrual cycle in women with epilepsy. *Epilepsia*. 56(5):e58-62, 2015.

Ikonomidou-Turski C, E A Cavalheiro, L Turski, Z A Bortolotto, Z Kleinrok, L S Calderazzo-Filho, W A Turski. Differential effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on seizures produced by pilocarpine in rats. *Brain Res*. 18;462(2):275-85, 1988.

Jacobs MP, Leblanc GG, Brooks-Kayal A, Jensen FE, Lowenstein DH, Noebels JL, Spencer DD, Swann JW. Curing epilepsy: progress and future directions. *Epilepsy Behav*. 14(3):438-45, 2009.

Janoušek, J.; Barber, A.; Klein, P. Use of Premarin as a Seizure Precipitant in Subjects Undergoing LTV EEG Monitoring for Pre-Surgical Work up. *Epilepsia*; Annual AES meeting abstracts: Abst. 3.145; 2006.

Joshi S, Rajasekaran K, Kapur J. GABAergic Transmission in Temporal Lobe Epilepsy: The Role of Neurosteroids. *Exp Neurol*. 244: 36-42, 2013.

Kalkbrenner KA, Standley CA. Estrogen modulation of NMDA-induced seizures in ovariectomized and non-ovariectomized rats. *Brain Res*. 964(2):244–249, 2003.

Kiernan JA. Anatomy of the temporal lobe. *Epilepsy Res Treat*. 176157, 2012.

Kovacs R, Heinemann U, Steinhauser C. Mechanisms underlying blood-brain barrier dysfunction in brain pathology and epileptogenesis: role of astroglia. *Epilepsia* 53 Suppl 6:53–59, 2012.

Laidlaw, J. Catamenial epilepsy. *Lancet*. 271, 1235-1237, 1965.

Leite JP., Bortolotto ZA., Cavalheiro EA. Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 14:511-517, 1990.

Leite JP., Garcia-Cairasco N., Cavalheiro EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Research*; 50(1-2):93-103, 2002.

Lemos T, Cavalheiro EA. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp Brain Res*. 102(3):423-8, 1995.

Lim G, Yang F, Chu T, et al. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2000; 20: 5709–5714

Loddenkemper T, Kotagal P. Lateralizing signs during seizures in focal epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 7:1-17, 2005.

Logothetis J, Harner R, Morrell F, Torres P. The role of estrogens in catamenial exacerbation of epilepsy. *Neurology*. 9(5):352-60, 1959.

Lurton D, Cavaleiro E A. Neuropeptide Y immunoreactivity in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Exp. Brain Res.* 116, 186-190, 1997.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62(4A): 609-614, 2002.

Margeat E, Bourdoncle A, Margueron R, et al. Ligands differentially modulate the protein interactions of the human estrogen receptors alpha and beta. *J Mol Biol*, 326:77–92, 2003.

Margerison JH, Corsellis JA. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*; 89(3), 499-530, 1966.

McGinnis MY, Krey CK, MacLusky NJ, McEwen, BS. Steroid receptor levels in intact and ovariectomized estrogen-treated rats: an examination of quantitative, temporal and endocrine related factors influencing the efficacy of an estradiol stimulus. *Neuroendocrinology*; 33(3), 158-165, 1981.

Michael M, Holsinger D, Ikeda-Douglas C, Cammisuli S, Ferbinteanu J, DeSouza C, DeSouza S, Fecteau J, Racine R J, Milgram N W. Development of spontaneous seizures over extended electrical kindling I. Electrographic, behavioral, and transfer kindling correlates. *Brain Research* 793(1-2)197–211, 1998.

Morrell MJ, Giudice L, Flynn KL, Seale CG, Paulson AJ, Doñe S, Flaster E, Ferin M, Sauer MV. Predictors of ovulatory failure in women with epilepsy. *Ann Neurol*. 52(6):704-11, 2002.

Navarro M. G., Bramanti, P.; Osculati, F.; Chakir, A.; Nicolato, E.; Marzola, P.; Sbarbati, A.; Fabene, P.F. Does Pilocarpine-Induced Epilepsy in Adult Rats Require Status epilepticus? PLoS ONE. 4(6), e5759, 2009.

Pavlov I, Walker MC. Tonic GABAA receptor-mediated signalling in temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology* 69:55-61, 2013.

Peebles CT, McAuley JW, Moore JL, Malone HJ, Reeves AL. Hormone replacement therapy in a postmenopausal woman with epilepsy. *Ann Pharmacother* ;34(9):1028–1031, 2000.

Pereira M Jr, Soares JM Jr, Valente SG, Oliveira PB, Cavaleiro EA, Amado D, Baracat EC. Estrogen effects on pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy in rats. *Maturitas*, 62(2) 190–196, 2009.

Pinel JPJ, Rovner LI. Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. *Exp. Neurol.* 58(2) 190-202, 1978a.

Pinel JPJ, Rovner LI. Electrode placement and kindling induced experimental epilepsy. *Exp. Neurol.* 58(2) 335–346, 1978b.

Pitkänen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *The Lancet Neurology.* 1(3): 173-81, 2002.

Quigg M, Fowler KM, Herzog AG, et al. Circalunar and ultralunar periodicities in women with partial seizures. *Epilepsia.* 49(6):1081-5, 2008.

Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 32(3):269-79, 1972.

Reddy DS. The role of neurosteroids in the pathophysiology and treatment of catamenial epilepsy. *Epilepsy Research*; 85: 1-30, 2009.

Reddy DS, Role of anticonvulsant and antiepileptogenic neurosteroids in the pathophysiology and treatment of epilepsy. *Front Endocrinol.* 2(38), 2011.

Reddy DS. Role of hormones and neurosteroids in epileptogenesis. *Front Cell Neurosci* 7:115, 2013.

Scharfman HE, Smith KL, Goodman JH, Sollas AL. Survival of dentate hilar mossy cells after pilocarpine-induced seizures and their synchronized burst discharges with area CA3 pyramidal cells. *Neuroscience.* 104: 741–759, 2001.

Scharfman HE, Goodman JH, Rigoulot M, Berger RE, Walling SG, Mercurio Thomas C, Stormes KS, Macluskay NJ. Seizure susceptibility in intact and ovariectomized female rats treated with the convulsant pilocarpine. *Exp Neurol* 196, 73-86, 2005.

Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti Mda, Amado D, Calderazzo L, Cavaleiro EA. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 81(3):345-65, 2009.

Segal M. Synaptic activation of a cholinergic receptor in rat hippocampus. *Brain Res.*; 452: 79–821, 1988.

Seinfeld S, Goodkin HP, Shinnar S. Status Epilepticus. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 1;6(3): a022830, 2016.

Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 294:76-95, 1990.

Singh P, Singh M, Cugati G, Singh AK. Effect of epilepsy on female fertility and reproductive abnormalities. *Journal of Human Reproductive Sciences.* 4(2):100-1, 2011.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 119(1):7–35, 2010.

Soukupová M, Binaschi A, Falcicchia C, Zucchini S, Roncon P, Palma E, Magri E, Grandi E, Simonato M. Impairment of GABA release in the hippocampus at the time of the first spontaneous seizure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*. 257:39-49, 2014.

Spencer SS. Neural networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment. *Epilepsia*. 43(3):219-27, 2002.

Sperk G, Bellman R, Gruber B, Greber S, Marksteiner J, Roder C, Rupp E. Neuropeptide Y expression in animal models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 12 (Suppl.), 197-203, 1996.

Spiegel E, Wycis H. Anticonvulsant effects of steroids. *J. Lab. Clin. Med.* 30, 947-953, 1945 in Bäckström T. Epileptic seizures in woman related to plasma estrogens and progesterone during the menstrual cycle. *Acta Neurologica Scandinavica*. 54:321-347, 1976.

Stevens SJ, Harden CL. Hormonal therapy for epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*; 11:435-442, 2011.

Strzelczyk A, Reese JP, Dodel R, Hamer, HM. Cost of epilepsy: a systematic review. *PharmaEconomics*, 26(6):463-476, 2008.

Stuenkel CA. Neural regulation of pituitary function. *Epilepsia*; 32 Suppl 6:S2-10, 1991.

Taylor RJ, Reavill C, Jenner P, Marsden CD. Circling behavior following unilateral kainic acid injections into rat striatum. *Eur J Pharmacol*. 76:211-222, 1981.

Thomas SV, Managing epilepsy in pregnancy. *Neurology India*. 59(1):59-65, 2011.

Tominaga K, Yamauchi A, Shuto H, Niizeki M, Makino K, Oishi R, Kataoka Y. Ovariectomy aggravates convulsions and hippocampal gamma-aminobutyric acid inhibition induced by cyclosporin A in rats. *Eur J Pharmacol*; 430:243–249, 2001.

Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, Shorvon S, Lowenstein DH. A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*. 56(10):1515-23, 2015.

Turski L, Meldrum BS, Cavalheiro EA, Calderazzo-Filho LS, Bortolotto ZA, Ikonomidou-Turski C, Turski WA. Paradoxical anticonvulsant activity of the excitatory amino acid N-methyl-D-aspartate in the rat caudate-putamen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84(6):1689-1693, 1987.

Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*, 3(2):154-171, 1989.

Turski L, Andrews JS, Löschmann PA, Bressler K, Bortolotto ZA, Calderazzo-Filho LS, Cavalheiro EA. Substantia nigra regulates action of antiepileptic drugs. *Brain Res*. 520(1-2):232-9, 1990.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar S, KleinrokZ, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*. 9(3):315-35, 1983.

Valente S.G, Naffah-Mazzacoratti MG, Pereira Jr M, Silva I, Santos NF, Baracat EC, Cavalheiro EA, Amado D. Castration in female rats modifies the development of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Research* 49 181–188, 2002.

Valente S.G., Marques R.H., Baracat E.C., Cavalheiro E.A., Naffah-Mazzacoratti M.G., Amado D. Effect of hormonal replacement therapy in the hippocampus of

ovariectomized epileptic female rats using the pilocarpine experimental model. *Epilepsy Research* 82, 46-56, 2008.

Vannucci Campos D, Lopim GM, da Silva DA, de Almeida AA, Amado D, Arida RM. Epilepsy and exercise: An experimental study in female rats. *Physiol Behav.* 171:120–126, 2017.

Velíšek L, Velíšková J. New avenue of research: antiepileptic drug and estradiol neuroprotection in epilepsy. *Recent Pat CNS Drug Discovery*; 3:128–37, 2008.

Velíšková J, Velíšek L, Galanopoulou AS, Sperber EF. Neuroprotective effects of estrogens on hippocampal cells in adult female rats after status epilepticus. *Epilepsia*; 41:S30–35, 2000.

Vercueil L, Kahane P, François-Joubert A, et al. Basal ganglia involvement in rotational seizures. *Epileptic Disord.* 1:107–112, 1999.

Verrotti A, D'Egidio C, Mohn A, Coppola G, Parisi P, Chiarelli F. Antiepileptic drugs, sex hormones, and PCOS. *Epilepsia.* 52(2):199-211, 2011.

Vignoli A, Giordano L, Guerra D, La Briola F, Accorsi P, Savini MN, Iodice A, Canevini MP. Non-epileptic myoclonic attacks in infancy: three cases. *Epileptic Disord.* 16(4):433-8, 2014.

Wallis CJ, Luttge WG. Influence of estrogen and progesterone on glutamic acid decarboxylase activity in discrete regions of rat brain. *Journal of Neurochemistry*; 34:609–13, 1980.

Wallenstein M C. Attenuation of penicillin models of epilepsy by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Exp Neurol.* 98(1):152-60, 1987.

Wallenstein M C. Attenuation of epileptogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the rat. *Neuropharmacology.* 30(6):657-63, 1991.

Waszczak, B., Lee, E.K. and Walters, J.R., Effect of anticonvulsant drugs on substantia nigra pars reticulata neurons, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 239, 606-611, 1986.

Weiland NG. Estradiol selectively regulates agonist binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the CA-1 region of the hippocampus. *Endocrinol*; 131:662–8, 1992.

Williamson PD, Thadani VM, French JA, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD. Medial Temporal Objective Lobe Epilepsy: Videotape Analysis of Clinical Seizure Characteristics. *Epilepsia*, 39(11):1182-1188, 1998.

Wong M, Moss R. Long-term and short-term electrophysiological effects of estrogen on the synaptic properties of hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 12:3217-25, 1992.

Woolley CS, McEwen BS. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 336:293-306, 1993.

Woolley CS, McEwen BS. Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an *N*-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. *The Journal of Neuroscience*. 14:7680-7687, 1994.

Woolley DE, Timiras PS. The Gonad-Brain Relationship: Effects of Female Sex Hormones on Electroshock Convulsions in the Rat. *Endocrinology*. 70, 196-209, 1962.

Yacubian EMT, Garzon E. *Semiologia das crises epilépticas*. Lemos Editorial, 2003.

Yu W, Walling I, Smith AB, Ramirez-Zamora A, Pilitsis JB, Shin DS. Deep Brain Stimulation of the Ventral Pallidum Attenuates Epileptiform Activity and Seizing Behavior in Pilocarpine-Treated Rats. *Brain Stimul.*, 9(2):285-95, 2016.

Anexos

IX. ANEXOS

Anexo 1: Parecer do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de São Paulo.

São Paulo, 6 de julho de 2012
CEP Nº: 0211/12

Ilmo(a) Sr(a)
Pesquisador(a): JANISE DAL PAI
Disciplina/Departamento: Neurologia Experimental
Pesquisadores associados: Debora Amado Scerni (orientadora)

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

TÍTULO DO ESTUDO: Efeitos da castração no cérebro de animais submetidos ao modelo de epilepsia induzido por pilocarpina que não desenvolveram estado de mal epilético :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Investigar o papel da retirada dos hormônios sexuais através da castração no desenvolvimento do modelo da pilocarpina em ratas que não apresentam SE, a fim de verificar se essa condição hormonal pode modificar o desenvolvimento de epileptogênese nestes animais resistentes e se isso ocorre, quais as possíveis vias que estão envolvidas.

RESUMO: Estudo com 50 ratos Wistar, fêmeas, com 60 dias. Anestésico: cetamina e xilazina. Analgésico: ibuprofeno. Eutanásia: perfusão transcardíaca. Os animais serão submetidos ao modelo de pilocarpina e serão formados os seguintes grupos: G1 = PILO com SE (Pilo SE): animais que apresentaram SE (n = 10); G2 = PILO sem/SE e castradas (noSE OVX): animais que não desenvolveram SE e que serão castrados 24 horas após a injeção de Pilo (n = 10); G3 = PILO sem/SE e não castradas (noSE no-OVX): animais que não desenvolveram SE e que não serão castrados após a injeção de Pilo (n = 10). Além disso, outros dois grupos serão utilizados: G4 = Ratas castradas e injetadas com salina (conforme esquema abaixo) (CTL OVX): controle da cirurgia (n = 10); G5 = Ratas injetadas com salina (CTL): animais controle (n = 10). O tratamento com pilocarpina ou salina será realizado nas fêmeas durante a fase estro do ciclo estral. A castração será feita 24 horas após a injeção de pilocarpina. Serão analisados os seguintes parâmetros: 1- mortalidade após ocorrência de crise tônica; 2- mortalidade durante o período de SE; 3- animais que evoluíram para SE; 4- período de latência para a ocorrência da primeira crise após a injeção de Pilo; 5- latência do período silencioso (período em dias para a ocorrência da primeira crise espontânea); 6- frequência de crises durante a fase crônica; 7- atrofia genital; 8- alterações morfológicas, que serão analisadas por meio da técnica de neo-Timm, imunohistoquímica e método de coloração de cresil violeta (Nissl) e; 9- temperatura corporal, que será analisada antes da injeção de pilocarpina, 1h, 2h e 3h após a administração da droga.

FUNDAMENTOS E RACIONAL : Estudos anteriores demonstraram que a susceptibilidade ao estado de mal epilético (SE) induzido por pilocarpina em ratas muda de acordo com as fases do ciclo estral. Esses estudos também têm demonstrado que seguindo o SE induzido por pilocarpina ocorrem mudanças nos hormônios gonadais, hipofisários e hipotalâmicos, que poderiam contribuir para a sequência de eventos epiléticos. Nossos resultados indicaram que a castração/ ovariectomia (OVX) interfere com a epileptogênese no modelo da pilocarpina, sugerindo que hormônios sexuais femininos podem ter efeitos protetores contra o SE induzido por pilocarpina.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo.

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo- R\$ 2779,00

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 48 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 1/7/2013 e 26/6/2014

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo