UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - ICB1

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA HUMANA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

OCTAVIO AUGUSTO DE CARVALHO MAIA

**MODIFICAÇÕES RESPIRATÓRIAS NO MODELO DE EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE PILOCARPINA NO
HIPOCAMPO**

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Brasil (CNPq) – Código 166142/2017-4.

São Paulo

2019

RESUMO

Um dos principais fatores causadores de distúrbios homeostáticos observados nas epilepsias, são as complicações observadas no sistema respiratório, em especial, as apneias, que provocam aumento dos níveis de CO_2 (hipercapnia) e/ou diminuição dos níveis de O_2 no sangue arterial (hipoxemia). Os neurônios respiratórios, localizados na coluna respiratória ventral (VRC), constituem um dos principais grupamentos responsáveis por controlar a atividade respiratória. Trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram alterações respiratórias em dois modelos experimentais de epilepsia, o modelo de epilepsia audiogênica (WAR) e o de estimulação elétrica rápida da amígdala (ARK). No presente estudo, procuramos avaliar alterações respiratórias no modelo clássico de epilepsia do lobo temporal (ELT) com uma abordagem mais seletiva, via injeção intra-hipocampal de pilocarpina. Foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar (197-492 g; N = 4-9/grupo) com cânulas de aço inoxidável implantadas na região do hipocampo. Os parâmetros respiratórios analisados pela técnica de pletismografia de corpo inteiro foram a frequência respiratória (f_R), volume corrente (V_T) e ventilação-minuto (V_E). Nesses mesmos animais, também avaliamos os parâmetros de mecânica respiratória como a resistência Newtoniana de vias aéreas, viscância e elastância do parênquima pulmonar. Quinze e trinta dias após a injeção de pilocarpina (2,4 mg/ μl), observamos uma redução da resposta taquipneica frente a uma situação de hipercapnia (7% CO_2). Além disso, não foram observadas alterações significantes na V_E basal e durante estímulos hipóxicos (8% O_2) trinta dias após o status epilepticus. No entanto, quinze dias após a injeção de pilocarpina, observamos um aumento significativo da ventilação frente ao desafio hipóxico, mas não em condições basais. Também não foram observadas alterações na resistência das vias aéreas, na viscância e na elastância do parênquima pulmonar. Dessa forma, no modelo de ELT, com a injeção de pilocarpina no hipocampo, apenas a resposta de aumento da f_R foi atenuada, sugerindo que, pelo menos no período de até 30 dias, o padrão e ritmo respiratório apresentam-se intactos, mas o mecanismo de taquipneia parece estar comprometido mediante a uma condição de hipercapnia.

ABSTRACT

One of the main causes of homeostatic disorders observed in epilepsy is the complications observed in the respiratory system, especially apneas, which cause an increase in CO₂ levels (hypercapnia) and/or a decrease in O₂ levels in arterial blood (hypoxemia). The respiratory neurons located in the ventral respiratory column (VRC) are one of the main groups responsible for controlling respiratory activity. Recent data from our group has demonstrated respiratory changes in two experimental models of epilepsy, audiogenic epilepsy (WAR) and rapid stimulation of the amygdala (ARK). Here, we aimed to evaluate respiratory changes in the classic model of temporal lobe epilepsy (TLE) with intra-hippocampal injection of pilocarpine. Adult Wistar rats ((197-492 g; N = 4-9/group) with stainless steel cannulas implanted in the hippocampus region were used. The respiratory parameters analyzed by the whole-body plethysmography technique were respiratory rate (f_R), tidal volume (V_T) and ventilation (V_E). In these same animals, we also evaluated the parameters of respiratory mechanics such as Newtonian airway resistance, resistance of the pulmonary parenchyma and the elasticity of the pulmonary parenchyma. Fifteen and thirty days after pilocarpine injection (2,4 mg/ μ l), we observed a reduction of the tachypneic response to hypercapnia (7% CO₂). No significant changes were observed in basal V_E and during hypoxic stimuli (8% O₂). We also did not observe changes in airway resistance, pulmonary parenchymal resistance, and pulmonary parenchyma elasticity. Thus, in the TLE model with the injection of pilocarpine only the response of increased f_R was attenuated, suggesting that, at least in the period of 30 days, the respiratory pattern and rhythm are intact, but the tachypneic mechanism seems to be affected.

INTRODUÇÃO

Aspectos históricos da epilepsia

A epilepsia, é uma doença que despertou a curiosidade e dividiu opiniões a respeito da sua etiologia desde os períodos mais remotos da nossa civilização. A história dessa patologia apresenta documentos que remontam aproximadamente 4500 anos e nesses registros, são descritos sinais e sintomas (“inconscientes, postura anormal do pescoço, braços e pernas tensos, olhos abertos e espuma ao redor da boca”) aludindo ao que hoje se considera uma condição de crise epiléptica (PANTELIADIS et al., 2017). No entanto, ao longo dos séculos quase todas as culturas, incluindo os antigos babilônios (2000 a.C.), os egípcios (1700 a.C.) e os gregos (5 e 6 a.C.), acreditavam que a epilepsia tratava-se de uma desordem mística, uma vez que, os sintomas apareciam abruptamente e sem causa óbvia, razão pela qual atribuíam as manifestações observadas a possessão de espíritos malignos (WILSON, 1962; WILSON; REYNOLDS, 1990). Esse estigma social atrelado a doença, perdurou por muito tempo, incluindo os primeiros séculos da era comum (séc. I a IV) e a idade média (séc. V a XV). Contudo, ainda na Grécia antiga, Hipócrates (400 a.C.), tentou desmistificar essa condição patológica, implementando uma abordagem mais científica, na qual descreveu a epilepsia como uma doença do cérebro. No entanto, seus relatos não foram suficientes para promover grandes mudanças no comportamento e pensamento popular sobre epilepsia naquela época (LIPOURLLIS, 1968; FERNANDES, 2013).

Após a idade média, o início do século XVI, foi marcado por algumas mudanças, sobretudo no que diz respeito ao raciocínio clínico em relação à etiologia da epilepsia, que quando passou a ser compreendida como doença, favoreceu a gênese de um processo gradual de substituição das antigas práticas de tratamento implementadas. Além disso, ocorreram importantes avanços científicos, com destaque para os trabalhos descritos por Johannes Marcus Marci (1595-1667) e Charles Le Pois (1563-1636) que impactaram a definição de epilepsia a época, mas que ainda traziam algumas considerações, correlacionando espíritos com a sua patogênese (PANTELIADIS et al., 2017). Nesse sentido, o final do século XVII, destacou-se pelo desenvolvimento de uma técnica que possibilitou induzir experimentalmente crises epiléticas, ampliando as perspectivas de compreensão dos mecanismos por trás desse evento. Esse método, foi

criado por Charles Drelincourt (1633-1694), que promovia as crises ao introduzir uma agulha no quarto ventrículo do encéfalo de cães (DRELINCURTIUS, 1682).

No início do século XVIII, a ideia geral aceita pela comunidade científica, era de que a epilepsia se tratava de uma doença idiopática, tendo origem no sistema nervoso central (SNC), e outros órgãos internos. No entanto, na segunda metade desse mesmo século, importantes trabalhos descreveram tipos específicos de convulsões. Nesse cenário, o neurologista suíço Samuel August Tissot (1728-1797), foi o primeiro a descrever a síndrome de ausência em crianças, assim como também, lançou o primeiro livro moderno sobre epilepsia “*Traite de l’Epilepsie*” (TISSOT, 1770). Um pouco mais adiante, em 1789, William Cullen (1710-1790), caracterizou detalhadamente uma crise focal, descrevendo-a, como convulsões que acometiam apenas partes do corpo sem haver perda de consciência (CULLEN, 1791).

Já no século XIX, o interesse científico pela epilepsia aumentou consideravelmente, surgindo até mesmo novas entidades médicas interessadas no assunto. Ademais, John Hughlings-Jackson (1835-1911), considerado o pai da neurologia científica moderna, publicou importantes trabalhos entre 1866 e 1899 sobre ataques psicomotores e epilepsia e descreveu que essa doença era provocada por cargas elétricas repentinas, rápidas e excessivas, na substância cinzenta do encéfalo (JACKSON, 1870, 1958). Em concordância com esses achados, o neurofisiologista Gustav Fritsch (1838-1927) e o psiquiatra Edvard Hitzig (1838-1927) conseguiram por volta de 1870, induzir experimentalmente convulsões em um cão por estimulação elétrica, simulando o desarranjo encefálico relatado por outros pesquisadores (FRITSCH; HITZIG, 1870). Cinco anos mais tarde, o médico e fisiologista inglês, Richard Caton (1842-1926), demonstrou com o auxílio de um galvanômetro, oscilações de potencial elétrico nos hemisférios cerebrais de coelhos e macacos. Dessa forma, o interesse pela técnica eletroencefalográfica aumentou significativamente (CATON, 1875).

Com isso, boa parte das pesquisas do século XX, voltaram-se para o aprimoramento de um dos instrumentos mais importantes até hoje para o diagnóstico de epilepsia, o eletroencefalograma (EEG). Em 1912, Pavel Yurevich Kaufman (1877-1951) e Vladimir Vladimirovich Pravdich-Neminsky (1879-1952) relataram ter observado mudanças elétricas no encéfalo durante convulsões induzidas experimentalmente. Além disso, eles foram os primeiros a associar ataques epilépticos com descargas elétricas anormais no EEG (BERGER, 1933). Dois anos mais tarde, em 1914, os neurofisiologistas Cybulski e Jelenska-Macieszyna (1854-1919) publicaram as primeiras fotografias de um

EEG registrando a atividade elétrica dos encéfalos dos cães durante uma crise focal (CYBULSKI; JELENSKA-MACIESZYMA, 1914). Dessa maneira, a junção de todas essas evidências, torna a epilepsia uma das poucas patologias na história da medicina que pôde ser rastreada por milhares de anos (PANTELADIS et al., 2017; FERNANDES, 2013).

Características gerais sobre epilepsia

A epilepsia é a doença neurológica crônica grave mais prevalente em todo o mundo, afetando cerca de 70 milhões de pessoas, das quais 90% encontram-se em países com desenvolvimento não equilibrado (PDNE) (NGUGI et al., 2010; BELL et al., 2014; VARVEL et al., 2015; THUIS et al., 2019). Nos países desenvolvidos, a sua incidência apresenta uma distribuição bimodal, afetando mais expressivamente dois grupos etários, crianças com menos de um ano e indivíduos com mais de cinquenta anos, exibindo uma curva em forma de “U”. Nesse segundo grupo, observou-se também que a incidência aumenta de forma proporcional ao aumento da idade (BELL et al., 2014; SINGH; TREVICK, 2016). No que diz respeito aos PDNE, estudos epidemiológicos acerca da epilepsia apontam uma maior incidência sobre a população no início da idade adulta, com valores estimados em 60-100 novos casos a cada 100.000 habitantes, enquanto nos países de alta renda, essa incidência está ao redor de 30-50 novos casos para cada 100.000 habitantes/ano (BELL et al., 2014; OMS, 2016; SINGH; TREVICK, 2016).

Alvo de muitos estudos, por apresentar algumas manifestações clínicas (por exemplo, distúrbios respiratórios, seguidos de alterações cardíacas) ainda pouco compreendidas, a epilepsia, caracteriza-se pela ocorrência de convulsões espontâneas e recorrentes provocadas por mudanças paroxísticas focais ou generalizadas nas funções neurológicas em decorrência de uma atividade elétrica anormal no córtex, podendo com isso trazer inúmeras consequências neurobiológicas, cognitivas e psicossociais (DICHTER, 1994; FISHER, 2014). De acordo com o último relatório oficial da Liga Internacional Contra Epilepsia (ILAE), define-se como epilepsia: 1) a ocorrência de duas crises não provocadas com um intervalo superior a 24 horas entre os dois eventos; 2) uma única crise não provocada e a probabilidade de ocorrência de um novo evento nos próximos 10 anos, maior que 60%; 3) ou ainda o diagnóstico de síndrome epilética (FISHER, 2014). Além disso, cabe ressaltar que a epilepsia apresenta alguns fatores de risco, dentre os quais, podemos citar os tumores cerebrais, as doenças cerebrovasculares,

o uso crônico de álcool, traumatismos cranio-encefálicos, malformações corticais, herança genética e infecções do SNC. Em PDNE, infecções endêmicas, como a malária e a neurocisticercose, revelam-se como os principais fatores de risco (DUCAN et al., 2006).

Mais recentemente, foram realizadas algumas modificações referentes as causas, classificação e a terminologia das convulsões e epilepsia. Segundo a ILAE, as causas de epilepsia estão divididas em seis categorias: estruturais, genéticas, infecciosas, metabólicas, imunológicas e as formas desconhecidas. No contexto das modificações referentes a classificação, as convulsões foram pela primeira vez categorizadas em: focais ou parciais, generalizadas e de causas desconhecidas, ao passo que os tipos de epilepsia foram classificados em: focal, generalizadas, a combinação entre focal e generalizada e em causas desconhecidas. O nível de consciência subdivide as convulsões focais em pessoas com a consciência preservado ou prejudicado. As crises focais são ainda categorizadas pelas manifestações motoras (automatismos, atonia, movimentos clônicos, espasmos epilépticos, hipercinesia, mioclonia e movimentos tônicos) ou não motoras (automatismo, comportamento de apreensão, alterações cognitivas, sensoriais e emocionais). As crises generalizadas, também são classificadas em convulsões com manifestações motoras (movimentos tônicos, clônicos,ônico-clônicos, mioclonias, mioclonia-tônico-clônico, mioclonias atônicas, atonia e espasmos epilépticos) ou não motoras, que nesse caso estão relacionadas as crises de ausência (típicas, atípicas, mioclonias e mioclonia palpebral). Convulsões de início desconhecido podem apresentar características ainda não classificadas. Indivíduos, que eventualmente apresentem convulsões sem evidência clínica para um início focal ou generalizado podem ser classificadas como convulsões tônico-clônicas de início desconhecido. Estratégias como essa, que buscam compreender a epilepsia de maneira mais ampla, visam também otimizar o manejo das crises, assim como, proporcionar a realização de um diagnóstico mais preciso, uma vez que, o subdiagnóstico implicará numa conduta terapêutica inadequada, elevando a chance desse paciente em apresentar complicações mais severas que possam levá-lo a óbito (FISHER et al., 2017a; FISHER et al., 2017b).

A mortalidade precoce em pessoas com epilepsia, representa hoje um problema mundial de saúde pública. Em geral, PDNE, apresentam uma maior taxa de mortalidade quando comparados aos países de alta renda. No entanto, as causas são distintas, uma vez que os PDNE, apresentam maior taxa de mortalidade relacionada a fatores externos (por exemplo, acidentes). Contudo, até um terço de todas as mortes prematuras são

diretamente (por exemplo, estado epiléptico, lesões, morte súbita e inesperada na epilepsia - SUDEP) ou indiretamente (por exemplo, pneumonia por aspiração, suicídio, afogamento) atribuíveis à epilepsia (DEVINSKY, et al., 2016). Estudos epidemiológicos, apontam ainda, uma incidência em torno de 1,6-9,3% de mortalidade sobre a população geral com epilepsia. Além disso, os indivíduos com epilepsia apresentam uma taxa de mortalidade pelo menos duas ou três vezes maior quando comparados aqueles que não tem a doença. Apesar dos avanços no tratamento, as taxas gerais de mortalidade na epilepsia estão aumentando, e nesse cenário, a morte súbita e inesperada na epilepsia (SUDEP) é apontada como a principal causa de óbito entre esses pacientes (LATHERS et al., 1998; WANNAMAKER, 1985; LANGAN, 2000; THURMANET et al., 2014; DEVINSKY, et al., 2016). A causa desse evento é desconhecida e não existem até o momento, medidas preventivas efetivas além da supervisão e monitoramento dos pacientes (MAGUIRE et al., 2016). Alguns raros eventos dessa natureza que foram registrados durante o monitoramento concomitante do vídeo EEG, eletrocardiograma ECG e respiração, sugerem que a SUDEP é precedida por uma convulsão e seguida por apneia e assistolia (RYVLIN et al., 2013). A SUDEP é caracterizada como a morte súbita e inesperada de pacientes diagnosticados com epilepsia, com ou sem evidências de uma convulsão, testemunhada ou não, e que não tenha como causa base a ocorrência de um trauma, *status epilepticus* (SE) ou afogamento e não permaneçam outras causas prováveis de morte (NASHEF, 1997; HARDEN et al., 2017). Além da SUDEP, outros fatores de risco também podem estar inclusos como: acidente vascular encefálico (AVE), infecções do SNC, tumores encefálicos, convulsões febris prolongadas, além de outras ocorrências de SE (VARVEL et al., 2015).

***Status epilepticus* (SE)**

Status epilepticus (SE) é a expressão máxima da epilepsia, e classicamente é definido como uma condição caracterizada por uma convulsão epiléptica prolongada ou repetida em intervalos suficientemente breves para produzir uma invariável e duradoura crise epiléptica (GASTAUT, 1973; ROGER et al., 1974). De acordo com estudos mais recentes, a condição de SE é resultante de uma falha dos mecanismos envolvidos na interrupção das crises epiléticas ou o início da ativação de mecanismos associados a geração de crises anormalmente prolongadas (após o período t1 [t1 = 5 min]). Dessa forma, a permanência nessa condição por um tempo superior a trinta minutos (após o

período t2 [t2 = 30 min]), pode trazer consequências graves e irreversíveis a longo prazo, incluindo morte e injúria neuronal assim como também desajustes das redes neuronais e déficits funcionais (TRINKA et al., 2015). Esta é, portanto, uma definição conceitual, com duas dimensões operacionais: a primeira é a duração da apreensão e o ponto temporal (t1 = 5 min) onde a apreensão deve ser considerada como atividade convulsiva contínua. O segundo ponto temporal (t2 = 30 min) é o tempo de apreensão das convulsões em curso, após as quais existe um risco de consequências a longo prazo. No caso do SE, ambos os momentos (t1 aos 5 min e t2 aos 30 min) são baseados em experimentos com animais e pesquisa clínica. Múltiplos mecanismos a jusante, incluindo inflamação, ruptura da barreira hematoencefálica e alterações na expressão gênica, podem contribuir para processos patológicos posteriores, inclusive epilepsia crônica e declínio cognitivo (TRINKA et al., 2015; WALKER, 2016).

Epilepsia do lobo temporal (ELT)

A epilepsia do lobo temporal é o tipo mais comum de epilepsia focal ou parcial, e caracteriza-se por um aumento anormal e pela recorrência da atividade elétrica não provocada proveniente das porções mediais do lobo temporal. Estudos apontam, que dentre as diferentes formas de epilepsia, a ELT, aparece como uma das mais incidentes, representando cerca de 40-60% de todos os casos de indivíduos com epilepsia. Além disso, 30% desses pacientes, apresentam resistência ao tratamento farmacológico, ou seja, não há remissão das crises epiléticas mediante terapia medicamentosa, o que torna esses indivíduos fortes candidatos ao evento SUDEP, uma vez que esse fenômeno tem como principal fator de risco a frequência de crises epiléticas (RYVLIN et al., 2013; DERERA et al., 2017).

Modelo experimental de epilepsia induzido por pilocarpina

Dentre as diversas técnicas utilizadas para a indução da epilepsia, o modelo experimental desenvolvido por Turski e colaboradores em 1983, no qual a epileptogênese é induzido pelo agonista colinérgico muscarínico pilocarpina é considerado um dos modelos experimentais de epilepsia mais utilizados. O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina apresenta uma correlação satisfatória perante as características histológicas,

bioquímicas, farmacológicas, eletrofisiológicas e comportamentais encontradas na Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) em humanos. A ELT é uma doença encefálica comum e frequentemente refratária, caracterizada por crises recorrentes oriundas ou envolvendo estruturas como o hipocampo (FISHER et al., 2014; MOSHE et al., 2015).

A pilocarpina é um alcaloide parassimpatomimético, extraído das folhas da planta *Pilocarpus microphyllus* (*jaborandi*), encontrado na América do Sul, que age como um agonista colinérgico muscarínico. Em elevadas doses (300-380 mg/kg), ela pode induzir o SE, por agir em receptores colinérgicos muscarínicos centrais, culminando com lesões encefálicas específicas (córtex olfativo, complexo amigdalóide, tálamo, formação hipocampal e neocórtex) e movimentos estereotipados convulsivantes. A pilocarpina pode induzir o SE quando administrada por via intraperitoneal (i.p) (TURSKI et al., 1983), assim como também, quando injetada diretamente no encéfalo através de microinjeção. (FURTADO et al., 2011).

A administração da pilocarpina em ratos promove um quadro comportamental e alterações do EEG. Esse quadro pode ser dividido em 3 períodos distintos:

a) O período agudo é caracterizado por um SE límbico e que possui duração de aproximadamente 24 horas. Neste período, podemos observar alterações comportamentais e atividade epileptiforme no EEG, indicando um início da crise epiléptica sustentada, resultando em danos generalizados da parte frontal do cérebro. As alterações iniciais compreendem acinesia, oscilações atáxicas, automatismos faciais e tremores de cabeça. Após 15-25 minutos essas mudanças evoluem para convulsões motoras límbicas, contração dos membros anteriores, sialorreia (salivação exacerbada) e trismo (constrrição mandibular devido à contratura involuntária dos músculos mastigatórios). As crises se repetem a cada 2-8 minutos e levam ao estado de mal epiléptico dentro de 50-60 minutos após a administração de pilocarpina e podem durar aproximadamente 12 horas. (CAVALHEIRO, 1995; TURSK et al., 1983, 1984).

b) Um segundo período intermediário (silêncio) é caracterizado pela normalização progressiva do EEG e do comportamento com variação de 4 a 44 dias.

c) Por fim, um terceiro período que é crônico com crises espontâneas e recorrentes que começam de 4 a 44 dias após a injeção da pilocarpina e que se perpetua ao longo da vida do animal. As principais características das crises espontâneas e recorrentes observadas durante o período de longo prazo é que estas se assemelham às observadas nos seres humanos (ARIDA et al., 1999 a, b; CAVALHEIRO, 1995).

A pilocarpina pode interagir com receptores muscarínicos dos sub-tipos M1-M5. A ativação dos receptores M2 promoverá uma inibição da adenilato ciclase, diminuindo a liberação de acetilcolina e consequentemente a excitação neuronal. Por outro lado, a ligação da pilocarpina nos receptores M1 promove a ativação da fosfolipase C, disponibilizando o diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP3), o que resultaria na alteração na corrente de cálcio, potássio e aumento da excitabilidade encefálica (SEGAL, 1988). O aumento da excitabilidade ocorre provavelmente devido a uma diminuição da atividade ATPase no hipocampo, que não impede a repolarização da membrana plasmática e o funcionamento adequado da extrusão do cálcio (FERNANDES et al., 1996; FUNKE et al., 2003). A elevação da concentração de cálcio promove a liberação de glutamato, o que induz o chamado SE. O glutamato, atuando nos receptores ionotrópicos do tipo AMPA e cainato, permite a entrada de sódio e cálcio na célula. Como consequência, o magnésio, que é responsável pelo bloqueio dos receptores NMDA, é removido, permitindo que o glutamato, atuando em receptores NMDA, promova a entrada de mais cálcio na célula pós-sináptica. Esse mecanismo irá induzir a excitotoxicidade com consequente morte celular (SCORZA, 2006). Além disso, foi demonstrado que a pilocarpina, atuando em receptores muscarínicos, é capaz de produzir um desequilíbrio entre a transmissão excitatória e inibitória, gerando o SE (PRIEL; ALBUQUERQUE, 2002).

Dessa forma, fica claro que o modelo de ELT induzido por injeção de pilocarpina sistemicamente (i.p.) tem contribuído para a compreensão dessa doença em humanos, possibilitando o estudo de diversos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de epileptogênese. No presente estudo, utilizamos uma abordagem mais seletiva: um modelo de indução de convulsões estabelecido por injeção unilateral de pilocarpina no hipocampo, a fim de investigar as possíveis alterações respiratórias, bem como os mecanismos neurais envolvidos nesse modelo.

Comprometimento da atividade respiratória em modelos experimentais de epilepsia

Evidências recentes têm demonstrado que durante SE ocorre o aparecimento de apneias centrais associadas à dessaturação de O₂ e o aumento dos níveis de CO₂ em aproximadamente 50% dos casos (BATEMAN et al., 2008). Resultados do nosso laboratório mostraram uma redução significativa da ventilação e do consumo de O₂ basal em animais caracterizados com epilepsia audiogênica (cepa Wistar Audiogenic Rat -

WAR) (TOTOLA et al., 2016). Associado as alterações fisiológicas, observamos também uma correlação direta entre os déficits respiratórios com uma redução significativa no número de neurônios serotoninérgicos localizados na região da rafe, o que também poderia explicar a redução na ventilação e no consumo de oxigênio, uma vez que já foi demonstrado a importância dos neurônios dessa região para o controle do metabolismo e também da termorregulação (OOTSUKA e BLESSING, 2005). O fato que observamos uma redução na ventilação basal e no consumo de oxigênio, mesmo sem crise convulsiva, está em concordância com o que se acredita que poderia estar ocorrendo na SUDEP (TOMSON et al., 2005). Outra possível interpretação para a redução da ventilação basal é o fato de que a cepa WAR apresenta uma redução drástica da expressão de receptor NK1 na coluna respiratória ventral, incluindo os neurônios quimiossensíveis do núcleo retrotrapezóide (RTN) e os neurônios excitatórios do complexo pré-Bötzinger (PreBötC) (TOTOLA et al., 2016). Ambos os grupamentos neuronais são componentes cruciais da automaticidade respiratória (GUYENET e BAYLISS, 2015; DEL NEGRO et al., 2018).

Outro modelo experimental de epilepsia utilizado no nosso laboratório foi o de estimulação elétrica rápida do complexo amigdalóide (ARK). O modelo de ARK consiste em estimulações do complexo amigdalóide, produzindo inicialmente uma convulsão focal com mudança progressiva ao longo de repetidas estimulações. Com as repetições e a propagação das crises convulsivas para outras áreas do cérebro (em especial para a região contralateral da amígdala), os processos convulsivos tornam-se mais graves e são associados com o aumento da complexidade do limiar pós-descarga (duração, frequência e amplitude). De maneira similar ao modelo de epilepsia audiogênica, observamos que o modelo de ARK apresenta uma redução da ventilação basal, bem como uma redução do número de neurônios serotoninérgicos localizados na rafe bulbar (TOTOLA et al., 2019). Assim, diante de todo o exposto, no presente estudo procuramos caracterizar possíveis alterações respiratórias no modelo clássico de ELT com a injeção de pilocarpina no hipocampo.

CONCLUSÃO

No presente trabalho, estamos propondo que no modelo experimental de ELT, com a injeção de pilocarpina no hipocampo, os animais desenvolveram alterações nas respostas ventilatórias a hipóxia e hipercapnia, sem alterações nos parâmetros de mecânica respiratória ou mesmo no peso corporal e estatura dos animais. Acreditamos que a degeneração seja suficiente para afetar os grupamentos neurais localizados no tronco encefálico a ponto de gerar um desajuste na atividade respiratória. No entanto, acreditamos que ainda será preciso investigar os possíveis mecanismos que promovem disfunções respiratórias no modelo de ELT, com o objetivo de correlacionarmos com outros modelos experimentais de epilepsia utilizados no nosso laboratório (modelo WAR e o de estimulação rápida da amígdala ARK).

REFERÊNCIAS

- ARIDA, R. M.; SCORZA, F. A.; PERES, C. A.; CAVALHEIRO, E. A. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res.** v. 34, p. 99-107, 1999a.
- ARIDA, R. M.; SCORZA, F. A.; SANTOS, N. F.; PERES, C. A.; CAVALHEIRO, E. A. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy Res.**, v. 37, p. 45 –52, 1999b.
- BATEMAN, L.M.; LI, C.S.; SEYAL, M. Ictal hypoxemia in localization-related epilepsy: analysis of incidence, severity and risk factors. **Brain** v.131, p. 3239–3245, 2008.
- BELL, G. S.; NELIGAN, A.; SANDER, J. W. An unknown quantity – The worldwide prevalence of epilepsy. **Epilepsia.** v. 77 (7), p. 958-962, 2014.
- CATON, R. The electrical currents of the brain. **Br Med J**, v. 2, p.278, 1875.
- CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **Ital J Neurol Sci.**, v. 16, (p. 33-7), 1995.
- COLUGNATI, D. B. et al. Analysis of cardiac parameters in animals with epilepsy: possible cause of sudden death? **Neuropsiquiatr.** v. 63, p. 1035-1041, 2005.
- CULLEN, W. First lines of the practice of physic. Edinburgh: Bell & Bradfute and William Creech; 1791.
- CYBULSKI, N.; JELENSKA-MACIESZYMA, S. Action currents of cerebral cortex. **Bull Internat Acad.** v. 776–781, 1914.
- DEAN, J. B. et al. Depolarization and stimulation of neurons in nucleus tractus solitarii by carbon dioxide does not require chemical synaptic input. **Neuroscience.** v. 36 (1), p. 207-216, 1990.
- DEPUY, S. D.; STORNETTA, R. L.;BOCHORISHVILI, G.; DEISSEROTH, K.; WITTEN, I.; COATES, M.; GUYENET, P. G. Glutamatergic neurotransmission between the C1 neurons and the parasympathetic preganglionic neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus. **J Neurosci**, v. 33, n. 4, p. 1486-97, Jan 23 2013.
- DRELINCURTIUS, L. Experimenta anatomica. Leiden: Ernestum Gottfried Heyseum; 1682.
- ESCLAPEZ, M.; HIRSCH, J. C.; BEN-ARI, Y.; BERNARD, C. Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. **J Comp Neurol.**, v. 408, p. 449–460, 1999.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A.; GRAY, P. A. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu Rev Physiol*, v. 75, p. 423-52, 2013.

FERNANDES, M. J.S. Epilepsia do lobo temporal:mecanismos e perspectivas. **Estudos avançados** v.27 p.77-81, 2013.

FERNANDES, M. J. S.; NAFFAH-MAZZACORATTI M. G.; CAVALHEIRO E. A. Na⁺K⁺ATPase in the rat hippocampus: A study in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem Int.**, v. 28, p. 497–500, 1996.

FISHER, R.S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, p. 475– 482, 2014.

FU, C. et al. Chemosensitive Phox2b-expressing neurons are crucial for hypercapnic ventilatory response in the nucleus tractus solitarius. **Journal Physiology**. v. 595(14), p. 4973-4989, 2017.

FRENCH, J. A. et al. Clinical studies and anti-inflammatory mechanisms of treatments. **Epilepsia**. v. 58, p. 69-82, 2017.

FRITSCH, G.; HITZIG, E. U"ber die elektrische Erregbarkeit des Gro"hirns. **Arch Anat Physiol Wissen**, v. 37, p.300–332, 1870.

FUNKE, M. G. et al. Calcium homeostasis and temporal lobe epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr.*, v.6, p. 8–14, 2003.

FUNK, G. D.; GOURINE, A. V. CrossTalk proposal: a central hypoxia sensor contributes to the excitatory hypoxic ventilatory response. **The Journal of Physiology**. v. 596 (15), p. 2935-2938.

FURTADO, M. A. et al. Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. **Epilepsy and Behavior**. v. 20, p. 257-266, 2011.

GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M. C.; RAMALHO, M. J.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; NONAKA, K. O. Audiogenic and audiogenic-like seizures: locus of induction and seizure severity determine postictal prolactin patterns. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 53, n. 3, p. 503-510, 1996.

GOURINE, A. V. et al. On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. **The Journal Physiology**. v. 568 (3), p. 715-724, 2005

GOURINE, A. V. et al. Astrocytes Control Breathing Through pH-dependent Release of ATP. **Science**. v. 329 (5991), p. 571-575, 2010.

GUYENET, P. G.; MULKEY, D. K. Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 173, n. 3, p. 244-255, 2010.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Central respiratory chemoreception. **J Comp Neurol**, v. 518, n. 19, p. 3883-3906, 2010.

GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. **Neuron**, v. 87, n. 5, p. 946-961, 2015.

HAWRYLUK, J. M. et al. Channels determine serotonergic modulation of ventral surface chemoreceptors and respiratory drive. **J Neurosci**. v. 32, p. 16943-52, 2012.

HUCKSTEPP, R. T. R. et al. Connexin hemichannel-mediated CO₂-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. **The Journal of Physiology**. v. 588 (20), p.3901-3920, 2010

JACKSON, J. H. A study of convulsions. Trans Saint Andrews Graduate Assoc, v. 3, p. 162–204, 1870.

JACKSON, J. H. The study of convulsions. On the anatomical and physiological localization of movements in the brain. New York: Basic Books; 1958.

KIM, Y. J. et al. Severe peri-ictal respiratory dysfunction is common in Dravet syndrome. **The journal of clinical investigation**. v. 128 (3), p. 1141-1153, 2018.

KOŁOSOWSKA, K. et al. The role of IL-1 β and glutamate in the effects of lipopolysaccharide on the hippocampal electrical kindling of seizures. **Journal of Neuroimmunology**. v. 298, p. 146-156, 2016.

KUMAR, N. N. et al. Regulation of breathing by CO₂ requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. **Science**. v. 348 (6240), p. 1255-1260, 2015.

LANGAN, Y. Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP): risk factors and case control studies. **Seizure** v.9, p. 179–183, 2000.

LATHERS, C.M., SCHRAEDER, P.L., BOGGS, J.G. Sudden unexplained death and autonomic dysfunction. In: Engel, J., Pedley, T.A. (Eds.), *Epilepsy: a Comprehensive Textbook*. **Lippincott-Raven, Philadelphia, cap.1183**, p. 1943–1955, 1998.

LATHERS, C.M., SCHRAEDER, P.L., BUNGO, M.W. The mystery of sudden death: mechanisms for risks. **Epilepsy Behav**. v. 12, p. 3–24, 2008.

LAZARENKO, R. M. et al. Acid-sensitivity and ultrastructure of the retrotrapezoid nucleus in phox2b-egfp transgenic mice. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 517 (1), p. 69-86, 2009.

LIPOURLLIS, D. The suffix in presocratic philosophy and in the Hippocratic corpus (in Greek). Thessaloniki: Aristotle University; 1968.

MASSEY C.A.; SOWERS, L.P.; DLOUHY B.J.; RICHERSON, G.B. Mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy: the pathway to prevention. **Nat Rev Neurol** v.10, p.271–282, 2014.

MOSHE´ SL, PERUCCA E, RYVLIN P, TOMSON T. **Epilepsy**: new advances. *Lancet* 385 p. 884–898, 2015.

MULKEY D, K.; ROSIN, D. L.; WEST, G.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Serotonergic neurons activate chemosensitive retrotrapezoid nucleus neurons by a pH-independent mechanism. **J Neurosci.** v. 27, p. 14128-14138, 2007.

NASHEF, L. Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions. *Epilepsia*, v. 38, n. 11 Suppl, p. S6-8, Nov 1997.

NEI, M., HAYS, R. Sudden unexpected death in epilepsy. **Curr. Neurol.Neurosci.** v. 10, p. 319–326, 2010.

NICHOLS, N. L. et al. Chronic hypoxia suppresses the CO₂ response of solitary complex (SC) neurons from rats. **Respiratory Physiology and Neurobiology.** v. 168 (3), p. 272-280, 2009.

NICHOLS, N. L. et al. Chronic hypoxia suppresses the CO₂ response of solitary complex (SC) neurons from rats. **Respiratory Physiology and Neurobiology.** v. 168 (3), p. 272-280, 2009.

NIEDERMEYER, E. *The Epilepsies: Diagnosis and Management*. Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1990.

NGUGI, A. K.; BOTTOMLEY, C.; KLEINSCHMIDT, I. et al. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. **Epilepsia.** v. 51, p. 883–890, 2010.

OLIVEIRA, L. M. et al. Respiratory disturbances in a mouse model of Parkinson's disease. **Experimental physiology.** v. 104 (5), p. 729-739, 2019.

ONIMARU, H.; IKEDA, K.; KAWAKAMI, K. Relationship between the distribution of the paired-like homeobox gene (phox2b) expressing cells and blood vessels in the parafacial region of the ventral medulla of neonatal rats. **Neuroscience.** v. 212, p. 131-139, 2012.

OOTSUKA, Y.; BLESSING, W. W. Activation of slowly conducting medullary raphe-spinal neurons, including serotonergic neurons, increases cutaneous sympathetic vasomotor discharge in rabbit. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 4, p. 909-918, 2005a.

OOTSUKA, Y.; BLESSING, W. W. Inhibition of medullary raphe/parapyramidal neurons prevents cutaneous vasoconstriction elicited by alerting stimuli and by cold exposure in conscious rabbits. **Brain Res**, v. 1051, n. 1-2, p. 189-193, 2005b.

PAUDEL, Y. N. et al. Role of inflammation in epilepsy and neurobehavioral comorbidities: Implication for therapy. **European Journal of pharmacology**. v. 837, p. 145-155, 2018.

PRIEL, M. R.; ALBUQUERQUE, E. X. Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture. **Epilepsia**, v. 43, p. 40-46, 2002.

RACINE, R.; OKUJAVA, V.; CHIPASHVILI, S. Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, v. 32, n. 3, p. 295-9, 1972.

ROSSETTI, F. et al. EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). **Epilepsy Res**, v. 72, n. 2-3, p. 192-208, Dec 2006.

ROUNDTREE, H. M. et al. Orexin receptor antagonism improves sleep and reduces seizures in Kcna1-null mice. **Sleep**. V. 39, p. 357-368, 2016.

SANABRIA, E. R. G.; CAVALHEIRO, E. A. Epileptogênese: contribuição dos modelos experimentais. In: *Epilepsia* (Guerreiro, CAM; Guerreiro, MM; Cendes, F; Lopes-Cendes, I; eds), (pp 29-57). São Paulo: Lemos Editorial, 2000.

SCHREIHOFFER, A. M.; GUYENET, P. G. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. **J Comp Neurol**. v. 387, p. 524-536, 1997.

SCORZA F.A. et al. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **An Acad Bras Cienc**. 81(3), p. 345-65, 2009.

SINGH, A.; TREVICK, S. The epidemiology of global epilepsy. **Neurologic clinics**. v. 34, p. 837-847, 2016.

SOBRINHO, C. R. et al. Purinergic signalling contributes to chemoreception in the retrotrapezoid nucleus but not the nucleus of the solitary tract or medullary raphe. **The Journal Physiology**. v. 592 (16), p. 1309-1323, 2014.

TISSOT, D. M. Traite' de l'épilepsie: faisant le tome troisieme du traite' des nerfs et de leurs maladies. In: Didot PF (ed.), Paris: Didot le jeune; 1770.

THURMAN, D. J.; HESDORFFER, D.C.; FRENCH, J.A. Sudden unexpected death in epilepsy: assessing the public health burden. **Epilepsia** v.55, p. 1479–1485, 2014.

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

TOTOLA, L.T. et al. Impaired central respiratory chemoreflex in an experimental genetic model of epilepsy. **The Journal of Physiology**, v. 595, p. 983-999, 2017.

TOTOLA, L.T. et al. Amygdala rapid kindling epilepsy model impair respiratory rate in response to chemoreflex activation. **Brain Research**, 2018, in press.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res.** v. 9, p. 315-35, 1983.

TURSKI, W. A. et al. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res.** v. 12, p. 237-53, 1984.

WANG, S. et al. TASK-2 Channels Contribute to pH Sensitivity of Retrotrapezoid Nucleus Chemoreceptor Neurons. **The Journal of Neuroscience.** v. 33 (41), p. 16033-16044, 2013.

WANG, S. et al. Phox2b-Expressing retrotrapezoid neurons are intrinsically responsive to H⁺ and CO₂. **Journal Neuroscience.** v. 33 (18), p. 7756-7761, 2013.

WANNAMAKER, B.B. Autonomic nervous system and epilepsy. **Epilepsia.** v. 26 (1), p. 31–39, 1985.

WENKER, I. C. et al. Regulation of ventral surface CO₂/H⁺-sensitive neurons by purinergic signalling. **The Journal Physiology.** v. 590, p. 2137-2150, 2012.

WILSON, J. V.; REYNOLDS, E. H. Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a Babylonian treatise on epilepsy. **Medicine History**, v. 34, p.185–198, 1990.

WILSON, J. A. Medicine in ancient Egypt. **Bull History Medicine**, v.36, p. 114–128, 1962

VANN, N. C.; PHAM, F. D.; DORST, K.E, DEL NEGRO CA. Dbx1 Pre-Bötzinger Complex Interneurons Comprise the Core Inspiratory Oscillator for Breathing in Unanesthetized Adult Mice. **Eneuro**, v. 5 (3), p. 1-18 2018.

VARVEL, N. H.; JIANG, J.; DINGLEDINE, R. Candidate Drug Targets for Prevention or Modification of Epilepsy. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** v.55: (p. 229–247), 2015.