Gabriela de Matos Barbosa Pimenta

**Sono e epilepsia: estudo da arquitetura
do ciclo vigília-sono em animais do modelo experimental de
epilepsia do lobo temporal por pilocarpina.
Análise qualitativa e quantitativa**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Fisiopatologia
Experimental
Orientadora: Angela Cristina do Valle

São Paulo

2009

Gabriela de Matos Barbosa Pimenta

**Sono e epilepsia: estudo da arquitetura
do ciclo vigília-sono em animais do modelo experimental de
epilepsia do lobo temporal por pilocarpina.
Análise qualitativa e quantitativa**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Fisiopatologia
Experimental
Orientadora: Angela Cristina do Valle

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pimenta, Gabriela de Matos Barbosa

Sono e epilepsia : estudo da arquitetura do ciclo vigília-sono em animais do modelo experimental de epilepsia do lobo temporal por pilocarpina. Análise qualitativa e quantitativa / Gabriela de Matos Barbosa Pimenta. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Angela Cristina do Valle.

Descritores: 1.Sono 2.Epilepsia do lobo temporal 3.Ratos Wistar

4.Pilocarpina 5.Transtornos do ciclo sono-vigília 6.Sonhos 7.Núcleo supraquiasmático

USP/FM/SBD-296/09

*Aos meus pais, Tânia e Francisco por serem exemplos de vida, coragem,
respeito e amor ao próximo.*

*Ao meu amado marido Felipe, por estar ao meu lado nesta jornada,
dedicando-me amor e paciência.*

*Aos meus irmãos, Júnior, Tarcila e Maria Luiza, amores e orgulhos de minha
vida.*

Acima de tudo,

*Ao meu eterno incentivador, Professor Doutor Tarcísio de Matos (in
memorian)*

Agradecimentos

À Profa. Dra Angela Cristina do Valle, pelos estímulos e incentivos constantes que me trouxeram até aqui. Por me orientar com grandeza, simplicidade e humildade, mostrando-me como trilhar os caminhos da pesquisa.

Agradecimentos muitos especiais ao Prof. Dr. Marcus Vinícius Baldo, pelo exemplo de ética, profissionalismo e dedicação.

A Rodrigo Tsai e Mariana Matera Veras por terem enriquecido essa pesquisa.

À Eloisa Vicente, por sua lealdade, compreensão e paciência em momentos difíceis...

Aos meus queridos amigos de jornada: Ana Maria Santos, Andrea Choi, Arnaldo Cheixas, Elton Pallone, Juliana Yule Vicente, Sueli Botte e, Thays Yoko, por seu apoio, carinho e companheirismo nos momentos de dificuldades, nas alegrias e conquistas, durante esses anos de convivência.

Ao meu principal objeto de estudo, os ratos, sem os quais não poderia ter desenvolvido essa pesquisa.

A todos que, de alguma forma contribuíram para a concretização desta tese.

*Duvidar de tudo, ou crer em tudo. São duas soluções igualmente cômodas,
que nos dispensam, ambas, de refletir.*

Henri Poincaré

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Sono.....	3
1.2 Epilepsia	11
1.2.1 Histórico da epilepsia	13
1.3 Epilepsia experimental	16
1.3.1 Modelo da pilocarpina.....	17
1.4 Sono e epilepsia.....	19
1.5 Justificativa.....	29
2. Objetivo.....	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. MÉTODOS	32
3.1 Modelo da pilocarpina	33
3.2 Monitoramento das crises espontâneas recorrentes	35
3.3 Implante de elétrodos.....	35
3.4. Registros eletroscilográficos.....	40
3.5 Análise histológica	43
3.6 Análise estatística	44
4. RESULTADOS	46
4.1 Análises comportamentais.....	46
4.1.1 Frequências das crises espontâneas recorrentes	48
4.1.2 Análise etológica.....	49
4.1.3 Análise eletrofisiológica	50
4.2. Análises quantitativas	57
4.2.1 Estudo do CVS e episódios oníricos.....	57
4.2.1.1 Duração total de cada fase do CVS.....	57
4.2.1.2 Duração total das fases do CVS em função dos ciclos claro escuro	58
4.2.1.3 Duração total das fases em função dos períodos.....	60
4.2.1.4 Estudo dos episódios oníricos	62
4.2.1.5 Resumo dos valores estatísticos das análises do CVS e episódios oníricos	65
4.2.2 Análise da sequência natural das fases de sono e vigília	66
4.2.3 Volume do núcleo supraquiasmático	67
5. DISCUSSÃO.....	69
5.1 Frequências das crises espontâneas recorrentes.....	72
5.2 Presença de todas as fases do ciclo vigília-sono nos ratos epilépticos.....	74
5.3 Caracterização das fases de vigília e sono.....	77
5.4 Efeitos da epilepsia no ciclo vigília-sono	79

5.5 Efeitos da epilepsia no comportamento onírico.....	84
5.6 Núcleo supraquiasmático.....	85
6. CONCLUSÃO.....	88
7. ANEXOS.....	89
8. REFERÊNCIAS.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS

ASA	American Sleep Association
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CS	ciclos de sono
CVS	ciclo vigília-sono
EEG	eletroencefalograma
ELT	epilepsia do lobo temporal
ILAE	International League Against Epilepsy
MAC	medicações anticonvulsivantes
PILO	pilocarpina
PP	sono pré-paradoxal
REM	rapid eye movement
SAOS	Síndrome da Apnéia Obstrutiva do Sono
SE	<i>status epilepticus</i>
SD	sono dessincronizado
SS	sono sincronizado
VA	vigília atenta
VR	vigília relaxada
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Foto ilustrativa dos elétrodos corticais e subcorticais	36
Figura 2 - Mapa citoarquitetônico e funcional do córtex cerebral do rato .	37
Figura 3- Esquema de corte transversal do encéfalo de rato	37
Figura 4- Foto ilustrativa da cirurgia de implante de elétrodos	39
Figura 5- Foto ilustrativa dos procedimentos finais da cirurgia de implante de elétrodos	40
Figura 6- Foto ilustrativa da gaiola de Faraday	41
Figura 7- Representação gráfica da frequência de crises nos ciclos claro e escuro	48
Figura 8- Trechos de vigília atenta de animal não epiléptico e epiléptico.....	52
Figura 9- Trechos de vigília relaxada de animal não epiléptico e epiléptico.....	53
Figura 10- Trechos de sono sincronizado de animal não epiléptico e epiléptico.....	54
Figura 11- Trechos de sono pré-paradoxal de animal não epiléptico e epiléptico.....	55
Figura 12- Trechos de sono dessincronizado de animal não epiléptico e epiléptico.....	56
Figura 13- Duração total das fases do CVS de animais não epilépticos e epilépticos.	58
Figura 14- Duração total de cada uma das fases do CVS em função dos ciclos claro e escuro.....	60
Figura 15- Duração total das fases do CVS em função dos períodos	62
Figura 16- Duração total dos episódios oníricos entre os grupos epiléptico e não epiléptico	63
Figura 17- Duração total dos episódios oníricos em função dos ciclos claro e escuro	64
Figura 18- Duração total dos episódios oníricos em função dos períodos.	65

Figura 19- Distribuição do número de episódios de CVS completos nos grupos epiléticos e não epiléticos	66
Figura 20- Distribuição do número de episódios de CS completos nos grupos epiléticos e não epiléticos	67
Figura 21- Foto ilustrativa de cortes coronais do núcleo supraquiasmático	68
Figura 22- Foto ilustrativa da posição dos elétrodos subcorticais na região hipocampal.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Duração total dos estágios de vigília e sono.....	89
Tabela 2 - Duração total dos estágios de vigília e sono em função dos ciclos claro e escuro.....	89
Tabela 3 - Duração total dos estágios de vigília e sono em função dos períodos.....	90
Tabela 4 - Duração total do comportamento onírico em 22 horas, em função dos ciclos claro e escuro e dos períodos.....	91
Tabela 5 – Quadro resumo dos valores estatísticos encontrados no estudo do ciclo vigília-sono e episódios oníricos.....	65
Tabela 6 – Número de episódios de ciclos regulares e ciclos de sono completos	92

Pimenta GMB. Sono e epilepsia: estudo da arquitetura do ciclo vigília-sono em animais do modelo experimental de epilepsia do lobo temporal por pilocarpina: Análise qualitativa e quantitativa [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 128p.

INTRODUÇÃO: As relações entre sono e epilepsia são complexas e de grande importância clínica. A melhor compreensão das inúmeras lacunas que permeiam essa relação reforçaria os alicerces para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes que pudessem contribuir para o bem-estar do paciente portador de epilepsia e transtornos do sono. **OBJETIVO:** O presente estudo teve como principal objetivo o estudo comportamental e a caracterização eletrofisiológica do ciclo vigília-sono (CVS) de ratos adultos tornados epiléticos por pilocarpina. **MÉTODO:** Ratos Wistar machos (N=6), tornados epiléticos após *status epilepticus* (SE) induzido por pilocarpina e não epiléticos (N=6) foram submetidos à cirurgia extereotóxica para implante de eletrodos bipolares nas áreas corticais (A3, somatosensorial) e hipocâmpais (CA1) de ambos os hemisférios. Registros contínuos de 24 horas foram submetidos à minuciosa análise visual e os seguintes parâmetros foram analisados: identificação e quantificação dos padrões eletrofisiológicos das fases do ciclo CVS; duração dos episódios oníricos ocorridos durante o sono dessincronizado (SD); padrão de ocorrência do CVS assim como do ciclo de sono (CS), e análise do volume do núcleo supraquiasmático. Os estudos da distribuição do CVS e comportamento onírico foram submetidos à Análise de Variância Multivariada - MANOVA, ao passo que as análises da ocorrência dos ciclos (CVS e CS) e volume do núcleo supraquiasmático foram submetidas ao teste da Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores e ao teste de Mann-Whitney, respectivamente. **RESULTADOS:** Todas as fases do CVS foram identificadas nos ratos epiléticos. As fases da vigília e do sono eram permeadas por espículas e outros grafoelementos epileptiformes, como ondas delta espiculadas no SS e potenciais de alta frequência e baixa voltagem durante VA e o SD. Ao contrário do padrão de ocorrência típico

das fases de vigília e sono em ratos não epiléticos, o grupo epilético apresentou diferenças significativas quanto à distribuição dessas fases em função do período. Foi observada redução significativa de VA ($p < 0,002$) com concomitante aumento de SS ($p < 0,005$) e vigília relaxada (VR) ($p = 0,021$) no escuro, sendo que a VR era preponderante apenas na primeira metade da noite. Durante o dia, a quantidade de SS era maior no período da manhã ($p < 0,001$), ao passo que houve redução do SD ($p = 0,002$) concomitante com aumento de VA ($p < 0,001$) no período da tarde. Os animais tornados epiléticos por pilocarpina apresentaram redução no padrão de ocorrência do CVS e CS ($p = 0,004$ e $p = 0,003$, respectivamente). Não houve diferença estatística na duração dos episódios oníricos, assim como no volume do núcleo supraquiasmático entre os grupos analisados ($p > 0,63$ e $p = 0,47$, respectivamente). CONCLUSÃO: Os animais epiléticos apresentaram alterações na arquitetura do CVS, bem como nos padrões de ciclicidade evidenciado pelas alterações de comportamento, especialmente no ciclo escuro. Esses fatos sugerem possível comprometimento estrutural e/ou funcional das circuitarias responsáveis pela geração e manutenção das fases de vigília e sono, assim como dos sistemas de temporização do CVS. Tomados em conjunto, os dados reproduziram anormalidades do CVS observadas em pacientes epiléticos, sugerindo que o presente modelo pode ser uma importante ferramenta para o estudo de mecanismos subjacentes à epilepsia do lobo temporal e sono.

Descritores: 1.Sono 2.Epilepsia do lobo temporal 3.Ratos Wistar 4.Pilocarpina 5.Transtornos do ciclo sono-vigília 6.Sonhos 7.Núcleo supraquiasmático

Pimenta GMB. Sleep and epilepsy: study of sleep-awake cycle architecture in animals of pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: Qualitative and quantitative analysis [thesis]. São Paulo: School of Medicine, Sao Paulo University; 2009. 128p

INTRODUCTION: Relationships between sleep and epilepsy are complex and have great clinical importance as well. The full understanding of the various gaps present in this relationship would pave the ground for new studies that could generate new clinical approaches aiming to contribute to the well-being of the patient suffering from epilepsy and sleep disorders. **OBJECTIVE:** The present study aimed to carry out a behavioral analysis and electro-oscillographic characterization of the phases of sleep-wake cycle (SWC) of pilocarpine- induced epilepsy in adult rats. **METHODS:** Male Wistar rats that became epileptic after 60 days of pilocarpine-induced *status epilepticus* (SE) (N=6) and non epileptic ones (N=6) were submitted to extereotaxic surgery for implantation of bipolar electrodes in cortical (A3, somesthetic) and hippocampal (CA1) areas in both hemispheres. Twenty-four hour continuous registers were submitted to detailed visual analysis and the following parameters were studied: identification and quantification of electrophysiological parameters of phases of SWC, duration of oniric episodes during desynchronized sleep (DS), the pattern of occurrence of SWC and cycles of sleep (CS). In addition, the volume of suprachiasmatic nuclei was investigated. To analyze the architecture of sleep-wake phases and oniric behavior, Multivariate Analysis of Variance-MANOVA was utilized, whereas the pattern of cycles (SWC and CS) and volume of suprachiasmatic were submitted to Analysis of Variance with 2 factors-Two-way ANOVA and Mann-Whitney test, respectively. **RESULTS:** In the epileptic rats all phases of SWC were identified. The phases of wake and sleep were permeated by spikes and graph elements epileptiforms such as spiked delta waves in SS and low frequency waves with high voltage during AW and SD phases. In contrast to the pattern of normal rhythmic activity evident in non-epileptic rats the epileptic group presented significant differences concerning distribution of

the phases of SWC according to the period. In the dark cycle significant reduction of AW ($p<0.002$) was observed concomitantly with an increase of SS ($p<0.005$), while the relaxed wakefulness (RW) showed an increase during the first half of the night ($p=0.021$). In the light cycle, the SS was more prominent in the morning period ($p<0.001$), following by a reduction of DS ($p=0.002$) concomitantly with an increase of AW ($p<0.001$) during the afternoon in the epileptic group. The number of cycles with a regular sequence of each phase from awake to sleep (SWC) was significantly decreased ($p=0.004$), as was the number of cycles of sleep ($p=0.003$) in epileptic rats. No significant differences were found in duration of oniric episodes and volume of suprachiasmatic nuclei ($p>0.63$ e $p=0.47$, respectively) between non epileptic and epileptic groups. **CONCLUSION:** The data obtained revealed that after SE the epileptic animals presented some alterations in the SWC architecture as well as in the cyclicity patterns mainly in dark cycle. Such facts suggest a possible functional and/or structural impairment in the circuitry responsible for the generation of sleep and wake phases and in the SWC timing system. Taken together the data reproduced the abnormalities observed in patients, suggesting that the pilocarpine model is a suitable one to study sleep dysfunctions in temporal lobe epilepsy.

Descriptors: 1.Sleep 2.Epilepsy, temporal lobe 3.Rats, Wistar 4.Pilocarpine 5.Sleep disorders, circadian rhythm 6.Dreams 7.Suprachiasmatic nucleus

1. Introdução

A epilepsia e os distúrbios do sono são afecções altamente prevalentes na população geral; afetam pessoas de todas as classes sociais e de todo e qualquer país, em qualquer idade, sejam mulheres ou homens, ricos ou pobres, interferindo de maneira significativamente negativa na qualidade de vida dos acometidos por essas enfermidades.

Os elevados índices de ocorrência associados à abrangência e magnitude de seus efeitos deletérios tornam a epilepsia e os distúrbios do sono focos de atenção e de imoderada pesquisa. Tais características justificam, de forma inquestionável, a intensa busca de modelos experimentais que reproduzam as várias alterações do sono e da epilepsia humana, modelos que tornem possível um entendimento amplo dos mecanismos básicos comuns a essas patologias. Um modelo experimental é verdadeiramente útil quando consegue representar com fidelidade o fenômeno natural a que se vincula. Em relação à epilepsia, dentre as possibilidades criadas por cada modelo há que destacar o estudo de medicações anticonvulsivantes¹ (MAC) e a investigação dos neurotransmissores envolvidos no processo epilético, o que, além de permitir estender o conhecimento sobre a fisiopatologia, ainda contribui para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

¹ Apesar do termo “droga anticonvulsivante” ser comumente utilizado na área clínica, o conceito de DROGA não contempla as finalidades terapêuticas a qual o MEDICAMENTO é destinado. Droga: substância ou matéria-prima que tenha finalidade medicamentosa. Medicamento: produto farmacêutico tecnicamente elaborado ou obtido com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnósticos (Conceitos técnicos: Lei nº 5.991 ANVISA, 2009).

As relações entre sono e epilepsia são complexas e de grande importância clínica. Por exemplo, as parassônias, fenômenos típicos do sono que compreendem o sonambulismo e os terrores noturnos, foram confundidos por muito tempo com fenômenos epiléticos. A estreita relação entre sono e epilepsia inclui os efeitos do sono nas crises epiléticas e nas descargas interictais, assim como da epilepsia no sono, caracterizada por alterações da arquitetura do sono em indivíduos epiléticos, interações do sono noturno com o desempenho diurno e os efeitos da privação do sono na epilepsia. As descargas elétricas generalizadas características das epilepsias, em geral, aumentam em frequência durante o sono sincronizado (SS) e diminuem durante o dessincronizado (SD) (Broughton, 1990). Os complexos ponta-onda, por exemplo, que oscilam à frequência de 3 Hz e são típicos da epilepsia de ausência benigna da infância, são substituídas durante o SS por surtos de poliponta-onda irregulares, geralmente mais duradouras e espiculadas. No entanto, durante o SD as descargas são raras e quando ocorrem são similares as da vigília.

Esta pesquisa faz parte de um amplo programa de estudo de epilepsia experimental e de alterações do sono causadas pela epilepsia. Foi à investigação dos mecanismos do sono e do sonho, da função do ritmo teta hipocampal e da participação do hipocampo nesses mecanismos (Valle, 1992; Valle *et al.*, 1992; Valle, 1995) que criamos essa linha de pesquisa no Laboratório de Neurociências “Professor César Timo-laria” da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A partir desses estudos iniciais várias investigações vêm se desenrolando em nosso laboratório as quais têm contribuído de forma significativa para a compreensão de alguns mecanismos neurofisiológicos subjacentes ao sono e a epilepsia em modelos experimentais (Valle *et al.*, 1992; Valle, 1995; Simões *et al.*, 1996; Valle *et al.*, 1998; Alves, 1999; Andre *et al.*, 1999; Bruno-Neto *et al.*, 1999a, 1999b; Ferreira, 1999; Ferreira *et al.*, 1999; ; Bruno-Neto *et al.*, 2001a, 2001b; Ferreira *et al.*, 2003; Cheixas-Dias, 2005; Matos *et al.*, 2005; Vicente *et al.*, 2006; Matos *et al.* 2006, 2007, 2008; Santos *et al.*, 2008).

Creemos ser conveniente, em virtude da complexidade dos temas, expor, ainda que resumidamente, as principais características do sono, da epilepsia e de suas interrelações antes de tratarmos dos resultados de nossos experimentos.

1.1 Sono

O sono tem fascinado os povos do mundo todo desde a mais remota antiguidade, porém, por suas características peculiares especialmente com relação aos sonhos, atravessou os séculos povoados de lendas e crendices mágicas.

As funções do sono não são completamente conhecidas, embora, seja plenamente reconhecido como o período responsável pelo descanso do organismo e pelo aprendizado. Embora haja indícios de que ambas as funções sejam desempenhadas pelo sono, não se pode afirmar em definitivo por que nem para que existe esse estado. Em um livro clássico de

“Fisiologia do Sono”, Kleitman em 1963, afirmava que não se pode dizer com segurança se o estado fundamental é o de vigília, interrompido periodicamente pelo sono, ou o de sono, interrompido periodicamente pela vigília, com a finalidade de o organismo se alimentar, interagir com o meio e com os outros seres da mesma espécie.

Os primeiros estudos de sono baseavam-se exclusivamente na observação, abordando os fenômenos do sono de forma contemplativa. Os antigos fisiologistas e neurologistas não dispunham de instrumentos que permitissem avaliar o sono de forma mais poderosa do que simplesmente observar o indivíduo (humano ou de outra espécie) deitar-se e ficar imóvel (Timo-laria, 2000).

No final do século XIX, o estudo instrumental do sono teve início com a descoberta de que algumas variáveis já bem conhecidas, sobretudo a frequência respiratória e a glicemia, apresentavam patentes flutuações durante o sono (Kleitman, 1963). Um fato decisivo na história das pesquisas sobre sono foi a descoberta das oscilações de potencial no sistema nervoso (que chamaremos de eletroscilogramas) em humanos por Hans Berger no final dos anos 1920 e primeiros anos 30; Foi Berger mesmo quem registrou o primeiro eletroencefalograma (EEG) durante o sono, havendo descrito os fusos e as ondas delta que caracterizam as fases II, III e IV do sono humano. A fase do sono em que ocorre a atividade onírica (sonhos) - o SD ou sono REM (*do inglês rapid eye movement*), entretanto, só começou a ser estudada eletrofisiologicamente no início da década de 1950 (Aserinsky e Kleitman, 1953).

Bem antes, porém, vários fisiologistas demonstraram a existência de oscilações de potencial no sistema nervoso de várias espécies de mamíferos. Em 1870, o fisiologista inglês Richard Caton, utilizando eletrômetros capilares, demonstrou a existência de potenciais elétricos do córtex cerebral de coelhos e macacos (Berger 1929, citado por Valle, 1995²) e, em 1883 Von Marxow demonstrou que o córtex cerebral de diversas espécies produz oscilações eletrográficas com transientes fásicos após aplicação de estímulos visuais ou cutâneos. É interessante destacar que este autor havia descoberto os potenciais evocados importante parâmetro de estudo funcional na eletrencefalografia clínica (Berger 1929, citado por Valle, 1995²).

Os ingleses Gotch e Horsley (um dos inventores do aparelho e da técnica estereotóxica para abordagem do sistema nervoso central) descreveram em 1889 e 1891 oscilações de potencial do córtex cerebral de macacos e cães e muitos outros fisiologistas estudaram no século XIX os eletroscilogramas corticais de outras espécies animais (Timo-laria, 2000).

Após a invenção da eletroencefalografia por Hans Berger em 1929, os fisiologistas americanos Loomis, Harvey e Hobart (1935a, 1935b, 1936) realizaram o primeiro estudo sistemático dos padrões eletrencefalográficos durante o sono humano, descrevendo as fases do que chamamos sono sincronizado (também denominado *por sono de ondas lentas e sono não-REM*).

² Berguer H. Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Arch Psychiat. Nervenkr.* 1930;87: 527-570.

Apesar da minuciosa análise escapou-lhes a existência de uma fase de dessincronização durante o sono normal. Esta fase foi descoberta na França em 1950 por Passouant, que verificou que o EEG humano sofre alterações periódicas ao longo da noite, mas não lhe deu a importância devida (Valle, 1995). Foram Aserinsky e Kleitman (1953) que a descreveram, descobrindo a sua associação com um estado específico do sono relacionando a dessincronização do sono com os movimentos oculares e depois com a atividade onírica.

Essa fase de dessincronização dos eletroscilogramas corticais com concomitante movimentação ocular foi chamada de fase *emergente 1* e mais tarde recebeu a denominação de sono REM devido a ocorrência dos movimentos oculares rápidos nesse período. Em 1972, Moruzzi, responsável por muitas descobertas de mecanismos fundamentais do sono, propôs a denominação de sono dessincronizado devido ao aspecto mais importante desta fase do sono que é a dessincronização cortical. Na mesma época, Jouvett (1972) descobriu essa fase no gato e a denominou de fase paradoxal do sono, devido a sua semelhança com os padrões de vigília com atenção.

O sono humano monopolizou os estudos por muito tempo após a descrição do EEG por Berger, porém, vários estudos foram realizados com outras espécies nas quais foram reconhecidas todas as fases do sono descritas para humanos.

Ursin (1968, 1971 e 1972), trabalhando com gatos e Negrão (1967) e Timo-laria *et al.* (1970) com ratos, dividiram o SS dessas espécies em fases distintas, caracterizadas por diferentes padrões de sincronização neocortical

semelhantes as do sono humano. No rato, como no gato e no homem, o SD ocorre sempre após o SS, ainda que este seja de curta duração. No paleocórtex os estados de sono e vigília seguem o padrão do neocórtex, porém, como foi verificado por Ricardo *et al.* (1980), quando o animal adormece o córtex piriforme apresenta uma sincronização que precede a do neocórtex com uma defasagem que pode chegar a trinta segundos, não tendo sido observada a presença de fusos nessa área cortical.

Durante o SS o arquicórtex do rato mostra atividade de ondas lentas como o sono humano (fusos e ondas delta), porém no SD predominam ondas teta e curtos períodos de dessincronização (Green e Arduini, 1954; Green, 1964; Torii e Wikler, 1966; Timo-laria *et al.*, 1970; Valle, 1992, 1995). A relação entre alerta vígil e SD é estreita, embora neste último o limiar de despertar possa ser muito elevado. Os eletroscilogramas neocorticais, por exemplo, são muito parecidos durante os dois estados do ciclo vigília-sono (CVS) e, como mostram os estudos de nosso Laboratório, as análises espectrais dos eletroscilogramas neocorticais e hipocampais revelam em ambas as fases do CVS ondas teta de modulação similar, porém de voltagem mais baixa no alerta vígil; a exceção é o córtex frontal, em que predomina tonicamente a dessincronização, embora também haja componentes teta mesclados (Timo-laria *et al.*, 1990 ; Valle, 1992; Valle *et al.*, 1992; Valle *et al.* 1995).

Vários fenômenos do SD humano têm sido identificados e enquadrados nas seguintes categorias; a) tônicos (que aparecem durante todo o tempo do SD); b) fásicos (que ocorrem intermitentemente). Os

eventos tônicos incluem supressão eletromiográfica, EEGs de alta frequência e baixa voltagem (20-30 μ V), alto limiar de despertar e redução da temperatura corpórea (Moruzzi, 1972). Os elementos fásicos incluem os movimentos oculares rápidos, contração dos músculos do tímpano, movimentos linguais e labiais, abalos musculares dos membros, alterações respiratórias e cardíacas e potenciais homólogos dos complexos ponto-genículo-occipitais. Em gatos e ratos, as espécies não humanas mais estudadas, ocorrem esses fenômenos e outros que já foram identificados, tais como aumento da temperatura cerebral, dessincronização no bulbo olfatório, ondas teta no córtex, no hipocampo e em numerosas outras regiões encefálicas e movimentos do rosto, vibrissas e das orelhas. Tais movimentos são sugestivos constituintes da atividade onírica nos roedores (Valle *et al.*, 1992).

É de suma importância ressaltar que os ratos albinos apresentam hábitos noturnos que caracterizam sua espécie. Durante o dia há um aumento significativo dos episódios de sono (cerca de 62%) ao passo que no ciclo escuro os roedores dormem cerca de 33%, mesmo apresentando prevalência do comportamento vigil (van Luijtelaaar e Coenen, 1983; Andersen, 2000).

Nas últimas décadas o estudo dos mecanismos do sono e dos sonhos vem assumindo grande importância. Numerosas abordagens, iniciadas no começo do século por neurologistas que investigavam o sono patológico provocado por algumas encefalites (Von Economo, 1918 citado por Triarhou,

2006³), evoluíram nos últimos tempos, resultando em conhecimento de muito valor, embora ainda insuficiente para a compreensão clara de onde o sono é gerado e que mecanismos estão implicados em sua gênese e manutenção. Tais pesquisas valem-se de várias técnicas, destacando-se as lesões eletrolíticas ou produzidas por neurotoxinas, a estimulação elétrica ou química, o registro de potenciais de neurônios, correlações hodológicas e a análise matemática dos potenciais eletroscilográficos (v. Steriade 1990; Valle, 1995).

O sono humano, que é o interesse final de quem estuda sono, desenvolveu-se muito nas últimas décadas no que tange a patologia, que acomete fração apreciável da população mundial. A invenção de técnicas de registro simultâneo de várias funções (EEG, eletrooculograma, eletromiograma, eletrocardiograma, respiração, saturação de hemoglobina no sangue e entre outras) tem propiciado notável progresso em diagnosticar anomalias no sono.

Atualmente, o sono, pode ser estudado por meio de técnicas de ressonância funcional, a qual revela alterações de fluxo sangüíneo em várias regiões ativadas (Larson-Prior *et al.*, 2009). Pode-se estudar o sono também por meio de tomografia por emissão de pósitrons (PET), que igualmente mostra regiões em que o consumo de glicose se incrementa, revelando pelo menos algumas estruturas implicadas no sono (Braun *et al.* 1997). A técnica eletrofisiológica é, entretanto, por ora insubstituível, quer por ser de baixo

³ Von Economo C. *Die Encephalitis Lethargica (Mit zwölft lithographischen-Tafeln)*. Franz Deuticke: Leipzig und Wien, 1918.

custo, por ser ampla e, sobretudo por sua altíssima resolução temporal, relevante por ser o sono uma função altamente dinâmica.

No que tange à patologia, o estudo do sono tem sua importância revelada pelas freqüentes análises de estudos epidemiológicos.

De acordo com a Fundação Nacional Americana de Sono (2008), 29% da população geral apresenta queixa de sonolência diurna e, 36% dos motoristas reclamam desse sintoma enquanto dirigem. Distúrbios que causam fadiga ou sonolência afetam diretamente a atenção e concentração durante a vigília (Thorpy, 2005). A classificação internacional de distúrbios de sono originalmente publicada em 1990 e revisada em 2005, pela Associação Americana de Sono (*ASA—do inglês American Sleep Association*) classificou 70 distúrbios de sono, sendo os mais comuns a insônia, a síndrome da apnéia obstrutiva do sono (SAOS), a síndrome das pernas inquietas e a narcolepsia.

Uma variedade de distúrbios de sono pode coexistir com a epilepsia, incluindo SAOS, narcolepsia e síndrome das pernas inquietas (Malow, 2007). Vale destacar que a SAOS acomete 33% dos pacientes portadores de epilepsia parcial refratária ao tratamento (Malow et al., 2000). A maioria das MAC convencionais pioram a SAOS, afetando os centros respiratórios, diminuindo os limiares para o despertar e induzindo a ganho de peso (Manni e Tártara, 2000).

1.2 Epilepsia

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (*WHO- do inglês World Health Organization*) a epilepsia é a mais comum e mais antiga enfermidade neurológica conhecida. É uma condição crônica que apresenta aspectos fisiopatológicos heterogêneos a qual se manifesta clinicamente por crises espontâneas recorrentes convulsivas e não convulsivas. A crise epiléptica é o resultado de uma disfunção transitória de uma parte ou de todo o cérebro, decorrente da descarga anormal e excessiva de uma população de neurônios que se tornam subitamente hiperexcitáveis. As crises epiléticas podem variar desde um breve lapso de atenção (ausência), sutis ou moderadas contrações musculares (espasmos) até graves e prolongadas convulsões (*status epilepticus*). A frequência das crises também é variável podendo ocorrer desde uma por ano a várias por dia (WHO, 2009)

A prevalência das epilepsias varia de 4: 1000 até cerca de 10: 1000 em países desenvolvidos e, em desenvolvimento (WHO, 2009). A epilepsia é a segunda doença neurológica que mais afeta a população em geral, apresentando menor incidência apenas para o acidente vascular encefálico (Stafstrom, 2006).

Segundo a ILAE (*do inglês International League Against Epilepsy*) as crises epiléticas podem ser classificadas em (I) *crises parciais ou focais* (simples e complexas) cuja diferença é a preservação da consciência no primeiro caso. As crises parciais complexas (com alteração da consciência) podem ou não evoluir para uma crise secundariamente generalizada (perda

de consciência), assim como uma crise parcial simples pode evoluir para uma parcial complexa e a seguir ocorrer generalização e (II) *crises primariamente generalizadas*, como as ausências, ausências atípicas, mioclônicas, atônicas, tônicas, clônicas e tônico-clônicas (ILAE, 1981).

Em reconhecimento ao fato de que uma classificação por tipo de crise não contempla outros aspectos da heterogeneidade própria da epilepsia, a ILAE idealizou uma classificação que considera o tipo de crise, o EEG, os dados prognósticos, fisiopatológicos e etiológicos. Foi conservada a classificação da epilepsia nas categorias parcial e generalizada, mas com a subdivisão de cada uma dessas em sintomática (lesões anatômicas ou histológicas), idiopática (etiologia genética) e criptogênica (etiologia desconhecida). Entretanto, tendo em vista os recentes avanços nos estudos de biologia molecular e a dificuldade em muitos casos de classificar alguns tipos de epilepsia, recentemente a ILAE (2009), sugeriu uma mudança em relação às nomenclaturas vigentes para a etiologia, substituindo o termo sintomático, idiopático e criptogênico por estrutural/metabólico, genético e sem causa conhecida, respectivamente (v. ILAE, 2009).

As epilepsias parciais complexas são as de maior incidência na população mundial e, também, as mais difíceis de serem tratadas possivelmente por apresentarem características físicas, motoras e psíquicas bastante complexas. Tais fatos as tornam, sem sombra de dúvida, o tipo de epilepsia de maior interesse de pesquisa tanto do ponto de vista clínico como experimental (Shneker e Fountain, 2004; Curia *et al.*, 2008). Estudos clínicos e experimentais levaram à descoberta de algumas possíveis causas

para a instalação da epilepsia focal, principalmente a do lobo temporal (Engel, 2001; Sloviter, 2005), porém está distante ainda esclarecer as causas reais, bem como os mecanismos pelos quais ocorrem as reverberações das crises.

1.2.1 Histórico da epilepsia

Por suas manifestações clínicas peculiares, às vezes impressionantes, como é, por exemplo, a perturbação da consciência, a epilepsia há milênios vem despertando curiosidade popular, médica e científica. Em grego, o termo epilepsia significa *algo que vem de fora, que assalta*, refletindo o pensamento coletivamente mágico de que é um feitiço, uma maldição dos deuses ou das entidades do mundo do invisível (Monteiro, 2001).

Os primeiros estudos sobre epilepsia datam de longas eras, quando a magia, a religião e a ciência estavam integradas no mesmo gesto cultural. A epilepsia também foi objeto de estudo científico sistemático há cerca de 2500 anos na ilha de Cos, parte da Grécia, onde Hipócrates, em meados do século V a.C., criou a Medicina objetiva, afastando-a da pura magia e das credences populares. Suas idéias sobre epilepsia foram retratadas no livro que passou a ser conhecido como "Da Doença Sagrada", com um novo enfoque que permitiu a melhor compreensão acerca dessa enfermidade (citado por Monteiro, 2001).

Entretanto, o estudo objetivo da epilepsia foi possível graças aos trabalhos lapidares de Hughlings Jackson (1834-1912) (citado por Monteiro,

2001). Examinando em necropsia as regiões do sistema nervoso lesadas em muitos tipos de epilepsia focal, Jackson estabeleceu firme correlação entre as regiões lesadas e os tipos de epilepsia. Com isso muito contribuiu para se conhecer a localização cortical de vários padrões motores, do que é exemplo a localização dos focos que originam convulsões focais. No que diz respeito à aura, Jackson descobriu a localização cortical da audição, da visão, da olfação, da gustação e da sensação de equilíbrio, esta relacionada com a área de representação cortical dos aferentes vestibulares. Estudos eletrofisiológicos posteriores só têm confirmado as descobertas de Jackson (Hogan e Kaiboriboom, 2003; Gomes, 2006).

Jackson acreditava, acertadamente, que a convulsão era o resultado característico de uma descarga excessiva e desordenada de certas regiões do encéfalo. Ele definiu como *crise epiléptica parcial* a convulsão cuja descarga neuronal envolve somente um dos hemisférios e de *crise epiléptica generalizada* quando ambos os hemisférios estão envolvidos, provocando não só contrações gerais, mas também perda da consciência. Jackson afirmava que cada tipo de epilepsia dependia de descarga súbita e temporária em uma região altamente instável, a qual recrutaria também células sadias de outros centros, provocando descargas secundárias. As alterações bioquímicas e funcionais da descarga inicial da doença passaram a ser vistas como algo importante para se compreender a fisiopatologia da epilepsia (Hogan e Kaiboriboom, 2003; Bruno-Neto, 2000). Suas investigações de 1870 o levaram a correlacionar as crises psicomotoras com o lobo temporal (Sengoku, 2002). Esse estudo iniciou uma série que

ascende a milhares de outros acerca da localização das funções do sistema nervoso e do conhecimento das diversas modalidades de epilepsias.

Em 1825 Bouchet e Cazauvieilh investigaram uma forma de epilepsia localizada no lobo temporal, que ficou conhecida como *esclerose mesial hipocampal*. Posteriormente, Sommer constatou que no hipocampo ocorria morte ou atrofia de neurônios de CA1 e que esta era a causa, não consequência, de crises convulsivas; por isso, esse campo hipocampal ficou conhecido como *setor de Sommer*. A esclerose mesial hipocampal e o *estado de mal* (ou *status epilepticus*) despertam muito interesse ainda hoje. Há evidências de ocorrência de reorganização sináptica quando há lesão da formação hipocampal, tanto na epilepsia humana como em modelos animais (Sutula *et al.* 1988, 1989; Leite *et al.* 1990a; Cavalheiro *et al.* 1991; Tauck e Nadler 1985; Babb *et al.* 1991, 1992; Sloviter 1991, 1992; Mello *et al.* 1993).

A epilepsia do lobo temporal (ELT) apresenta grande importância clínica, alta incidência e gravidade. É a forma mais comum de epilepsia focal e resistente ao tratamento farmacológico em adultos (Sloviter, 2005). Na ELT há geralmente história prévia de convulsão febril, hipóxia, trauma crânio-encefálico ou infecções do sistema nervoso central (French *et al.*, 1993). A caracterização da ELT dá-se pela presença de crises parciais complexas com início nas estruturas límbicas, as quais incluem o hipocampo e o giro denteado, que podem ou não apresentar generalização com perda de consciência (Sutula *et al.*, 1988; Scorza *et al.*, 2005)

A esclerose mesial hipocampal é um padrão histopatológico comum e específico em pacientes portadores de ELT. Esta envolve intensa perda

celular nas regiões hipocâmpais CA1 e CA3, neurônios da região polimórfica do giro denteado (hilo), camada III do córtex entorrinal e amígdala, além da preservação de células piramidais em CA2 (Meldrum, 1991).

O uso de modelos experimentais tem sido essencial para a compreensão de mecanismos neurais subjacentes às patologias, entre elas a ELT (Wieser, 2004). Embora o estudo experimental apresente algumas limitações quanto a sua aplicabilidade clínica, é ainda o melhor análogo para se estudar as condições encontradas em humanos (Stables *et al.*, 2003). Uma das vantagens do estudo experimental é o controle de diversas variáveis como idade e uniformidade genética (Guedes *et al.*, 2006).

1.3 Epilepsia experimental

Os modelos experimentais que melhor representam as epilepsias parciais complexas são aqueles que induzem uma condição crônica após um período de crises epiléticas intermitentes, o *status epilepticus* (SE), o qual pode ser desencadeado por estímulos elétricos ou químicos.

O ácido caínico e a pilocarpina (PILO) são os quimioconvulsivantes indicados na indução do SE, em modelo animal, que melhor caracterizam a fenomenologia ictal, os aspectos eletrográficos, as consequências cognitivas e neuropatológicas da ELT. Crises límbicas resultantes do SE prolongado, provocado pela aplicação sistêmica da PILO, representam um valioso modelo de ELT em que os achados anátomo-patológicos são equivalentes aos encontrados nos humanos (Cavalheiro *et al.*, 1991; Mello *et al.*, 1993; Covolan e Mello, 2000; Ferreira *et al.*, 2003).

1.3.1 Modelo da pilocarpina

Um modelo de ELT induzida farmacologicamente muito estudado no Brasil e em outros países é o causado por PILO (Turski *et al.* 1983; Priel *et al.* 1996; Ferreira *et al.* 1999; Longo *et al.*, 2002; Scorza *et al.*, 2005; Covolan e Mello, 2006). As crises epiléticas ocorrem em seqüência de manifestações motoras localizadas e depois complexas, que duram geralmente 15 a 30 minutos e progridem para o SE, o qual se mantém por muitas horas. Cavalheiro *et al.* (1991) observaram que ratos que apresentaram o SE evoluíam para crises espontâneas recorrentes após aproximadamente 15 dias.

A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico extraída de folhas da planta sul-americana *Pilocarpus jaborandi*. Quando injetada sistemicamente em altas doses (360 mg/kg), produz alterações comportamentais, eletrográficas e morfológicas com características muito similares às encontradas na ELT em humanos. O modelo desenvolvido em rato adulto (Turski *et al.*, 1983; Leite *et al.* ,1990; Cavalheiro *et al.*, 1991; Cavalheiro, 1995), é composto de três fases distintas: a primeira fase, denominada de fase aguda, é caracterizada pela presença de crises parciais complexas que evoluem para o SE, o qual se instala nos 40 minutos subseqüentes à injeção e dura em média entre 10 e 12 horas. A segunda fase do modelo, chamada de fase silente compreende aproximadamente 15 dias, sendo caracterizada pela ausência de eventos epiléticos comportamentais e eletrográficos, o que dificulta a diferenciação entre ratos tratados e não-tratados. O período silente termina com o aparecimento da

primeira crise tônico-clônica espontânea que ocorre por toda a vida do animal, sendo denominado período crônico (Cavalheiro *et al.*, 1991).

O estudo morfológico do tecido neuronal destes animais revela a presença de múltiplas lesões em diferentes áreas do encéfalo, principalmente, na formação hipocampal, no tálamo, na amígdala e no córtex entorrinal (Turski *et al.*, 1983). Estudos realizados por Lemos e Cavalheiro em 1995 mostram que é necessário pelo menos uma hora de SE para que a lesão ocorra e se estabeleça o quadro epiléptico crônico. Segundo os autores, a presença do SE por algumas horas, leva a 100% dos animais a apresentarem lesões e crises crônicas. A região hipocampal é uma das estruturas mais atingidas neste modelo. Uma extensa degeneração das células piramidais pode ser detectada nas regiões CA1 e CA3. Perda celular também é detectada na região polimórfica do giro denteado (Turski *et al.*, 1983; Cavalheiro *et al.*, 1991), permanecendo preservados os interneurônios GABAérgicos (Cavalheiro *et al.*, 1991). Além da perda celular, observa-se a presença de brotamento supragranular de fibras musgosas no giro denteado de ratos que se encontram tanto no período silente como no período crônico deste modelo (Mello *et al.*, 1993), alteração característica dos tecidos neurais de pacientes epilépticos (Babb *et al.*, 1991).

A utilização do modelo da PILO no estudo da fisiopatologia da ELT têm propiciado grande avanço na compreensão dos mecanismos neurais subjacentes à patologia (Turski *et al.* 1983; Cavalheiro, 1995; Longo e Mello, 1999).

1.4 Sono e epilepsia

Desde a mais alta antiguidade as relações entre os ritmos circadianos e as epilepsias são vistas com especial atenção. Essas intrincadas interações têm fascinado estudiosos ao longo dos séculos e recebido considerável destaque em históricos documentos científicos. As mais valiosas contribuições sobre esse tema emergiram das observações sistemáticas de Aristóteles e Hipócrates os quais inauguraram o estudo metodológico da ocorrência e da distribuição de crises epiléticas ao longo do CVS (Broughton, 1990; Longrigg, 2000).

Embora tenham atravessado os séculos como temas de interesse geral, tanto as crises epiléticas como os ritmos circadianos estiveram sujeitos a procedimentos e métodos de avaliação baseados exclusivamente na observação, os quais, não obstante as importantes contribuições geraram, também, conceitos polêmicos.

O estudo considerado *moderno* da epilepsia e de suas interações com os ciclos de sono tiveram início no final do século XVIII. Naquela época, o conceito de que a epilepsia era manifestação de origem encefálica já era dominante entre os neurologistas e psiquiatras e, alguns adeptos dessa teoria como John Hughlings Jackson, Esquirol, Freud, Bravais, Charcot, Raymond, Pierre-Marie, Déjérine, defendiam suas hipóteses baseados em estudos clínicos e anatomopatológicos (André, 2000; Gomes, 2006).

Gowers⁴ e Feré⁵ no final do século XVIII (citados por Mendéz e Radtke, 2001), foram os pioneiros nas investigações *modernas* das interações do sono com as epilepsias. Os estudos eram baseados em procedimentos experimentais relativamente simples, fundamentados na observação comportamental e na distribuição das crises epiléticas ao longo das fases dos CVS.

Em um estudo que incluía 840 pacientes hospitalizados com múltiplos tipos de crises epiléticas, Gowers (1885) mostrou que 21% das crises ocorriam exclusivamente à noite, 42% somente durante o dia e 37% em ambos os períodos. No mesmo estudo, o autor demonstrou que havia uma tendência das crises ocorrerem no início ou no final do sono. Em seus trabalhos, Gowers chamou a atenção para as diferenças marcantes entre as crises de tipo pequeno e grande mal, que aparentemente não se relacionavam com dano neuronal identificável, e as crises focais, que invariavelmente apresentavam lesões detectáveis no sistema nervoso central (Mendéz e Radtke, 2001).

Féré (1890), em um estudo similar ao de Gowers mostrou que mais de dois terços de uma amostra de 1985 crises estudadas ocorriam à noite e que começavam comumente às 18:00 horas se estendendo até às 8:00 horas da manhã seguinte (Mendéz e Radtke, 2001). Padrões semelhantes de ocorrência das crises ao longo do ciclo vigília-sono foram reportados por

⁴ Gowers WR. *Epilepsy and other chronic convulsive diseases: their causes, symptoms and treatment*. London: Churchill, 1885.

⁵ Féré C. *Les épilepsies et les épileptiques*. In: Passouant P, ed. EEG and sleep. Handbook of electroencephalography and clinical neurophysiology. Amsterdam: Elsevier, 1975.

outros investigadores pioneiros (Langdon-Down e Brain, 1929; Patry, 1971). Há que destacar a importante contribuição decorrente dos estudos de Langdon-Down and Brain (1929) o qual correlaciona o período de ocorrência de crises com a gravidade da epilepsia. Segundo esses autores, a distribuição difusa das crises durante os períodos do dia e da noite está associada com a duração e a gravidade da epilepsia.

Os avanços científicos para o entendimento das interações entre as fases do CVS e as epilepsias tiveram um salto qualitativamente relevante somente no final dos anos 1920 e início dos anos 30 após a invenção daquele que se tornaria o mais importante instrumento para diagnósticos e pesquisas na área da Neurofisiologia – o EEG. A invenção da eletrencefalografia por Hans Berger, em 1929, possibilitou o entendimento da fisiopatologia subjacente a vários fenômenos biológicos. Berger não só descreveu os dois mais conspícuos padrões eletroscilográficos que predominam durante a vigília no EEG humano, dando-lhes as denominações até hoje prevalentes - ritmos *alfa* e *beta*, como também, verificou que durante o sono eles se alteram, chamando-lhe a atenção sobretudo as ondas *delta* (v. Kleitman, 1963).

Impulsionados pelas relevantes descobertas sobre a atividade elétrica cerebral, vários neurologistas, ao perceberem a potencialidade da eletrencefalografia para o estudo das crises epilépticas, iniciaram uma série de estudos que culminaram na descrição e classificação das diversas epilepsias que se conhece atualmente. Davis *et al.* (1937) deram início a uma série de experimentos que muito contribuíram para o estudo da

epilepsia. Entre outros fatos que descreveram, destacam-se as modificações drásticas do padrão eletrográfico durante a atividade paroxística das crises epiléticas deixando patente a diferença dos traçados entre os períodos de crise e interictal (período entre crises). Em 1938 Gibbs *et al.* demonstraram e descreveram os padrões eletrofisiológicos característicos das crises generalizadas, os complexos ponta-onda, diferenciando-a das crises tônico-clônicas generalizadas.

Desde que o padrão ponta-onda foi detalhadamente descrito por Gibbs *et al.* em 1938, observou-se que o adormecer e o despertar influenciam de alguma forma no aparecimento desse fenômeno, o qual é intimamente relacionado com a epilepsia de ausência (Halász, 1972; Halász e Dévényi 1974; 1981; Dahl e Dam, 1985). De fato, o sono apresenta um efeito facilitador para a ocorrência das crises uma vez que a sincronização da atividade eletrofisiológica de origem talâmica é muito propícia para o aparecimento do fenômeno paroxístico (Burr *et al.*, 1986; Dahl e Dam, 1985; Bazil e Walczak, 1997).

Atualmente, um número crescente de publicações vem apresentado evidências inequívocas das complexas relações entre o CVS e as epilepsias (Janz, 1974; Billard *et al.*, 1982; Donat e Wright, 1989; Broughton, 1990; Degen e Degen, 1991; Bazil e Walczak, 1997; Crespel *et al.*, 1998, 2000; Bazil *et al.*, 2000a; Quigg, 2000). O aporte de informações decorrentes desses estudos tem propiciado subsídios para a elaboração de alguns princípios importantes relacionados a essas interações. Por exemplo, já está bem estabelecido que freqüentes interrupções dos ciclos de sono resultam

em significativa piora das crises epilépticas e, que a perda ou a diminuição da eficiência do sono pode ser um dos fatores responsáveis pela intratabilidade das epilepsias em alguns pacientes. A constatação de que a epilepsia *per se* pode resultar em fragmentação do sono ainda que as crises epilépticas ocorram somente durante a vigília (Bazil *et al.*, 2000a) e de que a privação de sono leva a uma maior suscetibilidade para a ocorrência de crises epilépticas (Janz, 1953; Broughton, 1990; Degen e Degen, 1991) são outras evidências importantes das interdependências entre sono e epilepsia.

A descrição de vários aspectos fisiopatológicos comuns aos eventos circadianos e as crises epilépticas tem sido fundamentada por meio de investigações cujo delineamento engloba a análise e correlação da influência das fases dos ciclos sobre os processos ictais e interictais (Gibbs e Gibbs, 1947; Billard *et al.*, 1982); as modificações da organização do sono induzidas pelas crises epilépticas (Touchon *et al.*, 1991; Bazil *et al.*, 2000a; De Almeida *et al.*, 2003); a análise das síndromes epilépticas específicas relacionadas ao sono (Patry *et al.* 1971;) e, a análise de outros episódios noturnos que podem ou não serem relacionados com as epilepsias (Lugaresi *et al.*, 1986).

Resultados de inúmeros estudos têm sugerido que os eventos epilépticos ativados pelo sono, particularmente, o SS, são conseqüências de uma disfunção dos mecanismos tálamo-corticais, fundamentais para a geração da sincronização desta fase do ciclo (Steriade *et al.*, 1998; Bazil e Walczack, 1997; Herman *et al.*, 2001). Para corroborar com tais evidências, registros eletrofisiológicos unitários e de campo *in vitro*, e *in vivo* tem

apresentado fatos sugestivos de que os mecanismos tálamo-corticais geradores de atividade sincronizada, inclusive fusos, participam de maneira importante na geração de atividade ponta-onda (grafelemento típico da epilepsia de ausência) e vice-versa (Kellaway, *et al.*, 1980; MacCormick, 1992; Miller, 1992; Bal e MacCormick, 1996; Kandel *et al.*, 1996; Bazil e Walczak, 1997; Kandel e Buzsaki, 1997; Futatsugi e Riviello-Jr, 1998; Neckelmann *et al.*, 1998; Steriade e Contreras, 1998; Timofeev *et al.*, 1998; Kostopoulos, 2000; Ure e Perassolo, 2000).

Paralelamente ao fato de haver influência direta do CVS sobre os eventos epilépticos como um todo, é possível encontrar modificações morfológicas dos potenciais eletroscilográficos que caracterizam algumas formas de epilepsia em função da fase do ciclo CVS na qual se expressam. Um fato interessante é que a morfologia do complexo ponta-onda (epilepsia de ausência) sofre modificações dependendo do estado comportamental concomitante. Os complexos ponta-onda encontrados em humanos durante a vigília transforma-se durante o SS em complexos de frequência irregular, com espículas mais acentuadas e aparência alterada. Tais grafelementos desaparecem quase completamente durante o SD e quando ocorrem tomam a forma original apresentada durante a vigília (Sato *et al.*, 1983; Dahl e Dam, 1985; Montplaisir *et al.*, 1985; Broughton, 1990).

Considerando a origem dos complexos ponta-onda, vale citar aqui que em nossas pesquisas em curso verificou-se algo que muda radicalmente os conceitos sobre onde primeiro surgem os potenciais ponta-onda. Em busca de sinais das fases da vigília e do sono no cerebelo, Simões *et al.*,

1996, Nunes *et al.*, (1999); Valle *et al.*, 2008 (*em redação*) verificaram que, quando os complexos ponta-onda ocorrem no córtex frontal também se registram tais potenciais do córtex cerebelar e dos núcleos mediais do cerebelo do rato; em alguns animais em que se registraram também, os eletroscilogramas do núcleo reticular oral da ponte verificou-se também a presença desses potenciais. A análise de tais potenciais por meio da técnica de coerência parcial direcionada (v. Baccalá e Sameshima, 1999; 2001) demonstrou que os potenciais ocorrem antes no núcleo pontino, depois no hipocampo e finalmente no córtex cerebral (provavelmente passando pelo tálamo).

É importante destacar que a influência do sono sobre as crises epiléticas e as descargas epileptógenas difere de acordo com o tipo de epilepsia (Malow, 2007; Viteri, 2007, Kotagal, 2008). Aproximadamente 20% dos eventos paroxísticos ocorrem exclusivamente durante o sono (Billard, 1982). Crises tônico-clônicas primárias ou secundariamente generalizadas, assim como, crises tônicas típicas da infância, por exemplo, síndrome de Lennox-Gastaut, ocorre preferencialmente durante o SS, com um pico de incidência bastante evidente uma a duas horas após o início do sono e outro por volta das seis horas da manhã (Montplaisir *et al.*, 1985; Chatrian, 1982⁶, citado por Broughton, 1990; Drake *et al.*, 1990), enquanto crises clônicas generalizadas ocorrem preferencialmente durante o despertar do SS (Billard, 1982). Na epilepsia mioclônica juvenil, as crises ocorrem preferencialmente uma ou duas horas após o despertar e são caracterizadas por crises tônico-

⁶: Chatrian GE, Lettich E, Wilkus RJ, Vallarta J. Poligraphic and clinical observations on tonic-autonomic seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. Suppl. 1982; (35): 101-24.

clônicas e mioclonias, sendo que a privação de sono é um fator facilitador para a ocorrência de crises nessa síndrome (Dinner, 2002). Na ELT, Quigg (1998) demonstrou a prevalência diurna, em especial no período vespertino para a ocorrência dos fenômenos paroxísticos, sugerindo uma correlação entre as condições refratárias ao tratamento medicamentoso e os ritmos circadianos. Em oposição a esse padrão, a epilepsia do lobo frontal evidenciou maior suscetibilidade de crises durante o sono (Dinner, 2002).

Reciprocamente, a epilepsia altera a organização da arquitetura dos ciclos de sono, primeiramente, pelo efeito agudo da crise durante o sono interrompendo sua continuidade, resultando na fragmentação e na redução da eficiência do sono e, secundariamente, pelo efeito crônico da epilepsia, prejudicando a organização dos ciclos e alterando a microestrutura do sono (Montplaisir *et al.*, 1982; Declerck, 1986; Touchon *et al.*, 1991; Bazil *et al.*, 2000a; Bastlund *et al.*, 2005).

Pacientes epilépticos que apresentam crises durante o sono invariavelmente padecem de sonolência excessiva diurna, associada a dificuldades de manter a vigília e a atenção o que prejudica os processos de aprendizagem (Broughton, 1990), além de sofrerem intensa fragmentação do sono devido a recorrentes micro-despertares, do que resulta redução da eficiência do sono (Montplaisir *et al.*, 1985; Malow e Varma, 1995).

Há inúmeras evidências de que a arquitetura do sono sofre diferentes anormalidades nos pacientes epilépticos: (1) aumento do período de latência para SS e SD; (2) aumento do número e da duração dos micro-despertares noturnos; (3) intensa fragmentação do sono, acompanhada de aumento do

número de mudanças de fase; (4) superficialização do sono caracterizada pela diminuição das fases III e IV e aumento das fases I e II; (5) redução e/ou fragmentação do sono REM; (6) redução da eficiência do sono, revelada pelas anormalidades encontradas durante a vigília (ex. sonolência excessiva); (7) nas epilepsias primárias ou secundárias a atividade eletroscilográfica de fundo pode estar tão intensamente comprometida que dificulta a caracterização dos estágios do sono; (8) a duração dos episódios de sono pode ser extremamente longa ou curta, demonstrando deficiência de passagem de uma fase para outra (Montplaisir *et al.*, 1985; Declerck, 1986; Shouse *et al.*, 1996).

Outra questão relevante a ser considerada quando se estuda sono e epilepsia é a que diz respeito às abordagens terapêuticas, especialmente, intervenções com MAC. Uma medicação é definida como anticonvulsivante quando promove a diminuição do número ou da intensidade das convulsões ao ser administrada por um longo período em pacientes epiléticos (MacDonald e Meldrum, 1995). Embora o objetivo seja sempre a remissão total das crises, a evidência de eficácia clínica na avaliação da ação anticonvulsivante de uma medicação é aceita quando ela promove uma redução de 50% na frequência de incidência das convulsões (Fraser, 1996).

As interações das MAC com os ritmos circadianos são de especial interesse, visto que, tanto a ocorrência das crises como a eficácia dessas substâncias variam em função da hora e do período dos ciclos (v. Baraldo, 2008). Protocolos com humanos e camundongos têm demonstrado que o padrão altamente organizado desses organismos varia de acordo com os

ritmos circadianos, influenciando a fisiologia e, conseqüentemente, as fases farmacocinéticas das MAC (Ohdo *et al.*, 1995 ; Nielsen *et al.*, 2008).

Não obstante a importância da cronofarmacocinética para o sucesso das terapias nas epilepsias, os estudos relacionando os efeitos das MAC no sono e na vigília têm apresentado dados bastante contraditórios. Tais discrepâncias se devem, pelo menos em parte, ao emprego de métodos diferentes em cada estudo no que diz respeito a, por exemplo, o perfil do grupo estudado, as doses utilizadas, a duração do tratamento, as falhas no controle das crises e os diferentes métodos de estudos polissonográficos (Foldvary-Schaefer e Grigg-Damberger, 2006).

A carbamazepina é o fármaco de primeira escolha para o tratamento das crises parciais com ou sem generalização secundária. Possui ação depressora sobre a excitabilidade neuronal por meio do bloqueio dos canais de sódio das membranas dos neurônios (Meldrum, 1996). Os efeitos da carbamazepina sobre o sono parecem obedecer á diferentes mecanismos em relação ao tempo de tratamento. Segundo os estudos de Yang (1989), o uso continuado dessa substância reduziu significativamente o número de micro-despertares noturno proporcionando um aumento na eficiência do sono durante os primeiros dias do tratamento, no entanto, a longo prazo, Manni *et al.* (1990) evidenciou uma redução significativa do SD nos pacientes epiléticos. A nova geração de MAC parece apresentar menor influência sobre o sono. A Gabapentina, por exemplo, aumenta a quantidade de SD com concomitante diminuição dos despertares noturnos em pacientes com epilepsia refratária (Placidi, 2000), ao passo que, o Topiramato, quando

utilizado em determinadas doses não afeta a arquitetura do sono em pacientes com epilepsia focal (Bonanni *et al.*, 2004).

Tomados em conjunto, a relação entre sono e epilepsia é extensivamente estudada em ensaios clínicos, no entanto devemos ressaltar que alguns vieses metodológicos, por ventura podem influenciar na resposta obtida. Para tal, os modelos experimentais são utilizados, minimizando variáveis como idade, sexo, MAC, fatores psicológicos entre outros. Ao percorrer da literatura até o momento, não há uma análise sistemática de grande envergadura sobre as influências da epilepsia na arquitetura do sono em animais portadores de crises parciais complexas.

1.5 Justificativa

Em função dos fatos apresentados na breve revisão da literatura pertinente aos temas deste estudo: *sono*, *epilepsia* e suas *interrelações*, sua indubitável relevância no âmbito das neurociências (clínica e experimental) e as inúmeras lacunas de conhecimento que ainda existem para a compreensão da fisiopatologia comum a esses eventos, acreditamos que é de suma importância apresentar um estudo sistemático de alguns parâmetros circadianos que proporcionem indícios dos mecanismos relacionados à geração e manutenção desses fenômenos e, reforcem os alicerces para novas investigações que possibilitem abordagens terapêuticas mais eficazes e, dessa forma possam contribuir para o bem estar do paciente com epilepsia e transtornos do sono.

Considerando-se:

1. A relevância do ciclo vigília-sono para a integridade e bem estar dos organismos;
2. A relevância das fases da vigília e do sono para a ocorrência e/ou prevenção de crises epiléticas;
3. A importância dos ciclos claro/escuro e das fases dos ciclos vigília-sono para abordagens terapêuticas;
4. As características do modelo experimental de epilepsia por pilocarpina o qual mimetiza vários aspectos da fisiopatologia da epilepsia do lobo temporal;
5. A importância desse modelo para o estudo da fisiopatologia da epilepsia parcial complexa e para abordagens terapêuticas, e;
6. A constatação, ao percorrer da literatura sobre sono e epilepsia, de que não há uma análise sistemática que avalie com a minuciosidade de nosso estudo, a reorganização da arquitetura do ciclo vigília-sono em ratos com epilepsia decorrente do *status epilepticus* induzido por pilocarpina na fase adulta;

Propomos no presente estudo,

Apresentar a caracterização comportamental e eletroscilográfica das fases dos ciclos vigília-sono de ratos adultos tornados epiléticos por pilocarpina na tentativa de fornecer indícios para um melhor entendimento das interações entre ritmos circadianos e a epilepsia.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Estudar o ciclo vigília-sono de ratos do modelo experimental de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina.

2.2 Objetivos específicos

Em ratos adultos tornados epilépticos após o *status epilepticus* induzido por pilocarpina apresentar:

- Quantificação da frequência de crises espontâneas recorrentes
- A caracterização dos padrões eletroscilográficos da vigília atenta e relaxada, assim como do sono sincronizado, pré-paradoxal e sono dessincronizado,
- A quantificação dos episódios oníricos durante o sono dessincronizado,
- Avaliação estrutural do núcleo supraquiasmático na tentativa de se correlacionar os achados eletrofisiológicos com prováveis alterações de um relógio biológico.

3. Métodos

No cômputo geral, foram utilizados 90 ratos *Wistar* machos adultos jovens, com peso inicial entre 200 e 250 gramas, oriundos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais eram mantidos em gaiolas individuais e condições controladas de luz e temperatura, com períodos de 12 horas claro/escuro sob luz artificial (07h00min-19h00min), a temperatura de 24°C e acesso livre a alimentos sólidos e água. Os experimentos foram realizados respeitando-se os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991). O presente estudo foi realizado após a aprovação da comissão de ética FMUSP (CAPESQ-HC/USP Nº 665/05).

O estudo era composto por protocolos experimentais com seis fases bem distintas, a saber:

- I. Indução do SE por injeção sistêmica de PILO;
- II. Período de 60 dias, o qual foi estipulado pelo grupo como um intervalo necessário para que a condição epilética estivesse uniformemente estabelecida em todos os ratos; também, foi realizado o monitoramento dos animais durante 10 dias por meio de um sistema de vídeo-câmera, com a finalidade de se caracterizar a frequência das crises ao longo do ciclo claro e escuro;
- III. Preparação do material e cirurgia estereotáxica para implante de elétrodos;
- IV. Recuperação cirúrgica e registros eletroscilográficos;

- V. Análise histológica para a determinação do volume do núcleo supraquiasmático e da posição dos elétrodos;
- VI. Análise visual e instrumental de todas as fases do CVS e dos episódios oníricos ocorridos durante o SD;

3.1 Modelo da pilocarpina

A pilocarpina é um potente agonista colinérgico muscarínico extraído da planta *Pilocarpus jaborandi* muito utilizado como colírio no tratamento do glaucoma.

Injeção sistêmica de PILO em altas concentrações provoca, em roedores, um padrão de crises límbicas repetitivas que leva ao desenvolvimento do SE, o qual pode persistir por várias horas. Esse período de crises contínuas é responsável por uma extensa perda neuronal que equivaleria ao evento inicial precipitante da esclerose mesial do lobo temporal. Após esta fase aguda de SE, inicia-se o período latente cuja duração compreende aproximadamente 15 dias, o qual é substituído pelo aparecimento das crises espontâneas recorrentes, que é o achado patognomônico do período crônico (Leite *et al*, 1990; Cavalheiro *et al.*, 1991; Cavalheiro, 1995). Os protocolos para indução do SE foi realizada de acordo com as etapas abaixo descritas:

1. Ratos adultos jovens eram pesados para o cálculo das doses de metil-escopolamina e pilocarpina;
2. A metil-escopolamina era diluída em água destilada na concentração de 1mg/kg e o volume era calculado de acordo com o número e o peso dos

ratos no grupo experimental. Trinta minutos antes da injeção de PILO os animais recebiam injeção subcutânea de metil-escopolamina. Essa substância era utilizada a fim de minimizar os efeitos periféricos decorrentes da ação da PILO.

3. A pilocarpina era igualmente diluída em água destilada na concentração de 5% e aplicada no peritônio dos animais na dose de 360mg/Kg.

4. Os ratos eram monitorados visualmente e por meio de um sistema de vídeo-câmera. Os eventos epileptógenos (segundo a Escala de Racine, 1972 a,b), os quais se iniciavam geralmente 5 a 10 minutos após a injeção de PILO eram acompanhados até que o animal desencadeasse as crises límbicas recorrentes, características do SE.

5. Após 6 a 8 horas do SE, os ratos eram levados à caixas individuais onde eram mantidos até o final dos experimentos. Durante os primeiros dias os animais eram assistidos pela pesquisadora que os alimentava até readquirirem independência para se manterem por si mesmos.

Os animais do grupo não epilético eram submetidos à aplicação prévia de metil-escopolamina, e após 30 minutos o grupo recebia solução fisiológica (0,9%NaCl) ao invés da PILO.

3.2 Monitoramento das crises espontâneas recorrentes

Os animais tratados com PILO que apresentaram SE eram monitorados diariamente durante 24hs por 10 dias a partir do 40º até o 50º dia utilizando-se um sistema de vídeo-câmeras. Os animais eram colocados em caixas acrílicas cilíndricas transparentes (31 cm de diâmetro x 29 cm de altura), as quais permitiam que o animal fosse visualizado independente da posição que assumisse. A altura e o formato cilíndrico dessas caixas foram planejados de maneira a garantir uma condição relativamente cômoda durante as crises epiléticas.

3.3 Implante de elétrodos

Os elétrodos para registro dos eletroscilogramas eram confeccionados com fio de níquel-cromo de 150 µm de diâmetro, isolados com teflon, provenientes da *California Fine Wire Company*®. Os elétrodos para registro cortical eram preparados colando-se em paralelo dois segmentos de fios com aproximadamente 3 cm de comprimento e cuja porção terminal era dobrada em T em cerca de 0,5 mm, da qual se removia o isolante, para tornar essa região permeável às correntes elétricas geradas no tecido nervoso. Os elétrodos destinados aos registros subcorticais eram igualmente colados em paralelo e a superfície permeável às correntes elétricas eram apenas as áreas circulares de corte. Para os registros dos movimentos da cabeça, rostro+vibrissas e olhos utilizamos segmentos unitários de fios de níquel-cromo de 40 mm de comprimento implantados nos grupos musculares dos segmentos citados (Figura 1).

Figura 1: Foto ilustrativa dos eléttodos corticais e subcorticais. A: soquete com eléttodos corticais soldados. B: Eléttodos subcorticais para implante no hipocampo. C: par de eléttodos subcorticais, note manguito de plástico próximo à base, para reforçar a colagem. Fonte: Andersen *et al.*, 2001.

Os eléttodos eram implantados bilateralmente nas áreas corticais somestésicas (A_3) $AP = -1,5\text{mm}$; $L = \pm 3,0\text{mm}$, nos campos CA_1 do hipocampo ($AP = -3,0\text{mm}$; $L = \pm 1,4\text{mm}$; $H = 3,0\text{mm}$). A implantação dos eléttodos corticais realizava-se de acordo com as coordenadas do mapa de projeções nos ossos do crânio, desenvolvido em nosso Laboratório (v. Timolária *et al.* 1970; Valle 1992), baseado nas áreas citoarquitetônicas segundo Krieg (1946) e funcional, segundo Zilles (1991), figura 2. Para a implantação de eléttodos nas regiões subcorticais era utilizado às coordenadas do atlas estereotático de Paxinos & Watson (1997), marcando na superfície óssea os pontos a trepanar (Valle, 1992; Valle *et al.*, 1992; Valle, 1995; Andersen *et al.* 2001) figura 3.

Antes da fixação do rato no aparelho estereotático procedia-se anestesia com Cloridrato de Cetamina (Ketalar[®], 30 mg/kg). A injeção de Ketalar[®] era precedida de administração de 0,2 mL de Diazepam, a fim de se provocar suave sedação, facilitadora da anestesia. Assim que esta

Figura 2. Mapa citoarquitetônico, (à direita segundo Krieg, 1946) e funcional (à esquerda, segundo Zilles, 1991), projetado sobre perfil e ossos do crânio e das suturas bregmática e lambdóidea, indicando as áreas da superfície dorsal. Escalas à direita e acima, em milímetros, em relação aos zeros extereotáticos anteroposterior (0 AP) e médio-lateral respectivamente. Abreviaturas: F1, córtex motor primário; F2 e F3, áreas pré-frontais, P1 e P2; áreas parietais 1 e 2; Ma área de projeção somestésica do membro anterior; Occ1M, área occipital medial 1; Occ2M, área occipital medial 2; Occ2L, área occipital lateral 2; CG1, giro do cíngulo 1; RSG, córtex retrosplenico granular; RSA, córtex retrosplenico agranular; 29d, área 29 D; T1: área auditiva primária.

Figura 3. Corte transversal do encéfalo de rato no nível utilizado para implantação de eletrodos subcorticais. A região hipocampal aparece hachurada no corte. Campo CA1 hipocampal: -3,0 mm. Fonte: Paxinos e Watson (1997).

atingisse nível adequado, a cabeça do rato era imobilizada no aparelho estereotático Kopf[®], fixando os condutos auditivos externos e o maxilar superior ao cabeçote do aparelho estereotático Kopf[®]. Em seguida era realizada uma incisão longitudinal na pele que recobre o crânio, desde a sutura bregmática até a inserção dos músculos trapézios. Com uma rugina, a fáscia craniana era desinserida e a porção exposta era lavada com água oxigenada a 10%, marcando-se então os pontos a trepanar. Ao longo de todo o procedimento de implantação dos elétrodos o rato era cuidadosamente observado, para se identificar superficialização da anestesia, que se manifesta com aumento da frequência e da amplitude respiratórias. Quando a anestesia começava a superficializar-se a dose original de anestésico era suplementada, até que se recuperasse o grau prévio de anestesia. Geralmente a dose de anestésico adequada para isso é 10% da inicial; alguns ratos, porém, necessitavam de duas ou três doses adicionais.

A trepanação, em cada ponto já marcado, era feita com uma broca de ¼' movida por uma minifuradeira Dremel[®]. A área de cada orifício era, portanto, maior que o diâmetro dos elétrodos, a fim de que estes passassem livremente por ele (Figura 4A). Os corticais eram implantados por mobilização manual e os subcorticais por meio de uma torre estereotática previamente calibrada (Figura 4B). Os pares de elétrodos destinados aos registros musculares (movimentos de cabeça, olhos e vibrissas) eram implantados, respectivamente, nos músculos trapézios, nos epicantos oculares e nos músculos elevadores da asa do nariz, dada a enorme

importância dessas estruturas para os comportamentos exploratórios e a vida do animal.

Figura 4: Foto ilustrativa da cirurgia de implante de elétrodos. A: elétrodos subcorticais; B: elétrodos subcorticais soldados, note (seta) os elétrodos corticais. Fonte: Andersen *et al.*, 2001.

Os elétrodos destinados ao registro da movimentação da cabeça eram implantados nos músculos trapézios de ambos os lados e levados até o soquete por um tubo de polietileno, para que subcutaneamente chegassem até os pinos do soquete, aos quais eram soldados. Procedimento similar era adotado para implantação dos elétrodos de registro dos movimentos do rostro+vibrissas e olhos (figura5).

A

B

Figura 5: Foto ilustrativa dos procedimentos finais da cirurgia de implante de elétrodos. A: Implantação de elétrodos destinados a registrar movimentos oculares. Fonte: Andersen *et al.*, 2001. B: Situação final dos procedimentos de implante de elétrodos.

Após total recuperação da cirurgia (7 a 10 dias), os animais eram submetidos aos registros eletroscilográficos e a análise comportamental. Um registro de curta duração (2 a 3 horas) era realizado antes do registro contínuo de 24hs a fim de se avaliar a qualidade dos eletroscilogramas certificando-se, sobretudo de que o animal não apresentava qualquer tipo de alteração ou, ainda, ponta-onda espontâneas. Uma vez validada a preparação, os animais eram levados à sala de registros e mantidos na gaiola de Faraday por algumas horas, durante três dias a fim de se habituarem à condição experimental e de se evitar estresse causado por uma situação nova, a qual poderia afetar o ritmo natural do ciclo vigília-sono.

3.4 Registros eletroscilográficos

Para a obtenção dos registros eletroscilográficos, os animais, eram hospedados em caixas acrílicas acondicionada no interior de uma caixa metálica com isolamento eletromagnético (Gaiola de Faraday), a fim de se

evitar a contaminação do registro eletrográfico com interferências externas (figura 6).

Figura 6: Animal submetido ao período de habituação na caixa de registro acondicionada dentro de uma gaiola de Faraday para o isolamento eletromagnético.

Os registros eram realizados em um eletrencefalógrafo Nihon-Koden (mod. Neurofax EEG 4400) com 21 canais, com pulso de calibração de 50 μ V, constante de tempo 0,3 s para as derivações encefálicas e 0,001s para as derivações musculares, filtros passa - baixa em 35 Hz para as derivações encefálicas, em 120 Hz para as derivações actigráficas e filtros “notch” para atenuação das frequências de 60 Hz. Os potenciais eram registrados diretamente no papel (15 mm/seg) e por meio de um sistema analógico-digital (placa conversora CAD 12/32 e programa de aquisição de sinais biológicos - Aqdados para Windows, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda). Os sinais eram armazenados no disco rígido do computador para ulterior análise. Os animais eram monitorados visualmente e seus comportamentos

eram anotados no papel para posterior correlação com os registros eletroscilográficos.

A análise e quantificação das fases do CVS seguiram os critérios pré-estabelecidos no nosso Laboratório (Timo-laria *et al.*, 1970; Timo-laria *et.al*, 1990; Valle *et .al.*, 1992). I) Vigília Atenta (VA): apresenta atividade eletroscilográfica cortical dessincronizada e ritmo teta hipocampal, concomitantes com intensa atividade muscular durante os comportamentos exploratórios; II) Vigília Relaxada (VR), caracterizada por redução do padrão dessincronizado e intrusão de ondas sincronizadas de baixa frequência, atividade teta hipocampal irregular e quiescência comportamental; III) Sono Sincronizado (SS): caracterizado pela presença de ondas delta e fusos nas áreas corticais e no hipocampo, as quais podem ou não ser síncronas com a atividade cortical; IV) Sono Pré-Paradoxal ou sono intermediário (PP): é caracterizado por atividade sincronizada (fusos intermitentes de alta amplitude e ondas delta) no córtex e ritmo teta conspícuo no hipocampo; V) Sono Dessincronizado (SD): caracterizado pela intensa dessincronização cortical (equivalente a vigília) e conspícuo ritmo teta no hipocampo concomitantes com abalos fásicos da cabeça, vibrissas e olhos (Timo-laria *et al*, 1970; Valle, 1992; Valle *et al.*, 1992; Valle, 1995).

Após o estagiamento das fases do CVS e da quantificação dos abalos motores característicos do SD, os valores de duração de cada variável eram lançados em uma planilha Excel de tal forma a chegar-se ao *continuum de todo* CVS para posterior análise estatística dos grupos (epiléptico e não epiléptico). Para homogeneizar as amostras a última hora de cada ciclo

(claro e escuro) foi retirada. Todas as variáveis foram analisadas inicialmente em função de 22 horas de experimento, seguida da distribuição das mesmas em função do ciclo claro (11hs) e escuro (11hs). No intuito de averiguar minuciosamente as possíveis alterações do CVS ao longo das horas, os dados foram analisados em função dos períodos, manhã (07:00-12:30), tarde (12:30-18:00), noite (19:00-00:30) e madrugada (00:30-06:00). O estudo compreendeu as seguintes análises: I) Fases do CVS: quantificação e distribuição de todas as fases de vigília e do sono ao longo do tempo. II) Eventos oníricos durante o SD: duração dos abalos motores de cada episódio de SD. III) Ocorrência de CVS completo, ou seja, número de ciclos com seqüências regulares das fases ($VA \rightarrow VR \rightarrow SS \rightarrow PP \rightarrow SD$). IV) Ocorrência de ciclos de sono (CS) completos ($SS \rightarrow PP \rightarrow SD$).

3.5 Análise Histológica

Quando os registros eram considerados satisfatórios os animais eram levados a eutanásia com uma superdose de anestésico (Cloridrato de Cetamina) e perfundidos transcardiacamente com solução salina (NaCl a 0,9%) seguida de Formol a 10%. Uma vez retirado do crânio o encéfalo era mantido em formol 10% por uma semana, após sete dias os encéfalos eram cortados por congelamento (Leica®, mod 1325) com espessura de 30 µm entre os cortes. As fatias referentes às coordenadas do hipocampo e do núcleo supraquiasmático eram montadas em lâminas gelatinizadas e coradas, pela Técnica de Nissl, após 24 horas. Depois de coradas, as fatias eram cobertas com lamínulas sobre Balsamo do Canadá.

As imagens do núcleo supraquiasmático eram capturadas por um sistema de microscopia acoplado a um computador e armazenadas, a um aumento de 40x do tamanho original. Por meio do software ImageJ®, um sistema de pontos (previamente estabelecido de acordo com o método de captura da imagem) era sobreposto à imagem original em todas as lâminas. Os pontos incidentes sobre o núcleo supraquiasmático foram contados em todas as lâminas e o critério para a contagem não diferiu entre os animais. O volume foi calculado segundo o Princípio de Cavalieri (Gundersen e Jensen, 1987), e à seguinte fórmula foi aplicada: $V = T \cdot a \cdot \sum P$, onde T=distância entre cortes, a=área associada a cada ponto, $\sum P$ =somatória de todos os pontos.

As lâminas referentes ao hipocampo eram verificadas para a averiguação da posição dos elétrodos subcorticais (Anexo D).

3.6 Análise Estatística

Primeiramente, todas as variáveis quantitativas eram submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov-Sminorff. Para o estudo da distribuição do CVS e dos episódios oníricos foi aplicada a Análise Multivariada da Variância (MANOVA). Uma vez que a amostra apresentava significância estatística, o pós teste de Tukey era aplicado no intuito de identificar quais entre todas as médias apresentavam diferenças significativas. As análises de fragmentação do CVS (ocorrência dos ciclos $VA \rightarrow VR \rightarrow SS \rightarrow PP \rightarrow SD$ e $SS \rightarrow PP \rightarrow SD$) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) de dois fatores com pós teste de Tukey. Para o estudo do volume do núcleo supraquiasmático entre os grupos epiléticos e não epiléticos foi aplicado o

teste não paramétrico de Mann-Whitney. Como nível de significância em todas as análises, foi adotado um valor de $p < 0,05$.

4. Resultados

Os resultados dos experimentos aqui relatados mostram algumas características comportamentais e eletrofisiológicas relevantes para o entendimento da vigília e do sono de ratos tornados epiléticos por pilocarpina.

Os eletroscilogramas de ratos não epiléticos e com epilepsia seja provocada por pilocarpina ou epilepsia espontânea do tipo ausência têm sido extensamente analisados em nosso Laboratório, sendo atualmente bem conhecidas as suas características (Timo-laria *et al.*, 1970; Valle, 1992; Valle *et al.*, 1992; Valle, 1995; Alves, 1999; Andre *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 1999; Bruno-Neto *et al.*, 1999a, 1999b; Bruno-Neto *et al.* 2001a, 2001b; Andre, 2002; Bruno-Neto, 2002; Ferreira *et al.*, 2003).

Para facilitar a compreensão de nossa análise, apresentaremos separadamente os resultados por tipo de protocolo realizado. Primeiramente serão expostas as análises comportamentais e descritivas, seguida das análises quantitativas.

4.1 Análises Comportamentais

Como comentado anteriormente no método, o estudo apresentou seis etapas bem distintas, a saber: (1) indução do SE por PILO; (2) período de 60 dias após o SE necessário para o estabelecimento da epilepsia; (3) cirurgia estereotóxica para implante de elétrodos e, (4) registros eletroscilográficos; (5) análise morfológica do núcleo supraquiasmático e (6) análise visual e

instrumental dos registros. Cada uma dessas etapas apresenta um grau de dificuldade inerente que somados dificultaram a obtenção de um número maior de animais.

Para a composição do grupo de ratos epiléticos foram utilizados 80 animais. No entanto, as dificuldades inerentes ao modelo da PILO (cuja mortalidade pode atingir 80%) somadas às freqüentes intercorrências na elaboração de um protocolo experimental de eletrofisiologia, tais como, morte do animal durante os procedimentos cirúrgicos, geralmente, devido á respostas inadequadas aos anestésicos; infecções locais ou generalizadas e respostas abruptas do animal durante a manipulação com conseqüente deslocamento do soquete de registro, resultaram no *N* de seis animais, porém suficiente para uma análise adequada de todos os parâmetros propostos no estudo.

No grupo controle, utilizamos 10 animais que foram submetidos às mesmas condições do grupo experimental. Fatores como complexos pontagonda e má qualidade na preparação foram determinantes para a exclusão de alguns animais do estudo.

Dessa forma, para a realização dos protocolos experimentais foram utilizados seis animais epiléticos com crises espontâneas recorrentes, e seis animais não epiléticos. A realização dos protocolos para coleta de dados eletrofisiológicos contou com aproximadamente 18 meses.

4.1.1 Frequências das crises espontâneas recorrentes

O monitoramento realizado por meio de câmeras nos permitiu identificar o perfil de ocorrência das crises espontâneas recorrentes quanto a sua frequência e ao período em que ocorriam (Figura 7).

Figura 7: A: Representação gráfica da frequência de crises espontâneas no ciclo claro e escuro. B: Frequências das crises epiléticas ao longo de 10 dias no ciclo claro. C: idem, ciclo escuro. Abreviaturas: CC: ciclo claro; CE: ciclo escuro

As análises demonstraram que a incidência de crises epiléticas era maior durante o ciclo claro (58%) do que no ciclo escuro (42%). No ciclo claro, a maior incidência de crises era no período vespertino (72,7%)

enquanto no ciclo escuro a distribuição das crises ocorreu de forma aleatória.

4.1.2 Análise etológica

Após o monitoramento das crises epiléticas, os animais eram submetidos à cirurgia de implante de eletrodos para ulterior análise eletrofisiológica. Dez dias após a recuperação cirúrgica, os ratos eram levados à sala de registros eletrofisiológicos, onde eram mantidos por duas horas nas gaiolas de Faraday. Esse período nos dias que precediam o registro de 24hs era necessário para que o animal se habituassem ao novo local e diminuísse o grau de estresse devido ao novo ambiente e a manipulação pelo experimentador. Com essas medidas, esperávamos estar subtraindo outras variáveis que pudessem interferir nos resultados. Após o período de habituação ao novo ambiente, iniciávamos os registros, acompanhando visualmente e anotando ininterruptamente todos os movimentos executados pelo animal durante as horas que duravam os registros.

Avaliação etológica: Ao serem colocados na caixa de registro os animais de ambos os grupos (epiléptico e não epiléptico) apresentavam intenso comportamento exploratório, que consistia em movimentação de cabeça, *rostrum* e olhos buscando explorar cada ponto da caixa em que se encontravam. O comportamento exploratório era basicamente olfativo e tátil, este executado com movimentação rápida das vibrissas. A presença de pelotas de ração no solo do assoalho da caixa desencadeava muitas

vezes comportamento alimentar, seguido em geral de quietude, caracterizando vigília relaxada e subseqüentemente sono.

4.1.3 Análise eletrofisiológica

O estagiamento do CVS seguiu os critérios previamente estabelecidos em nosso Laboratório (Timo-laria *et al*, 1970; Valle *et al*, 1992; Valle 1995).

Os animais não epiléticos apresentaram todas as características típicas de cada fase do CVS (ver método) (Figuras 8-12A).

A análise visual pormenorizada dos registros mostrou que todas as fases do ciclo vigília-sono; VA e VR, SS, PP e SD estavam presentes nos eletroscilogramas dos animais epiléticos.

Assim como o observado nos animais do grupo controle, a fase de vigília atenta dos animais epiléticos era caracterizada pela ocorrência de comportamentos exploratórios com intensa atividade motora expressa por movimentos, isolados ou simultâneos, de cabeça, *rostrum* e olhos, concomitante com dessincronização cortical e ritmo teta irregular nas regiões hipocampais. Entretanto, os eletroscilogramas corticais desses animais eram, freqüentemente, permeados por alguns potenciais atípicos que muito se assemelhavam aos grafoelementos observados em indivíduos epiléticos. Esses potenciais eram expressos como ondas lentas de alta voltagem, isoladas ou agrupadas em dois ou três elementos, que se intercalavam a dessincronização nas áreas somestésicas e, pela intrusão espículas nos eletroscilogramas de ambas as regiões corticais e

hipocampais. (Figura 8B); A VR, desses animais era caracterizada pela diminuição da atividade motora e, substituição da dessincronização cortical e do ritmo teta hipocampal por uma atividade eletroscilográfica resultante da combinação de sincronização com curtos períodos de dessincronização. Potenciais epileptiformes eram, freqüentemente, encontrados permeando os eletroscilogramas de ambas as regiões (Figura 9B); Na fase de SS, a atividade sincronizada (ondas delta e fusos) era caracterizada por apresentar um padrão espiculado concomitante com espículas isoladas no córtex e hipocampo (Figura 10B); Durante o PP, o animal epiléptico apresentou fusos de alta freqüência no córtex e ritmo teta no hipocampo, padrões eletroscilográficos característicos desta fase. Normalmente, eram observadas espículas que se interpunham a atividade teta hipocampal (figura 11B). O SD era caracterizado pela presença de potenciais de baixa freqüência e alta voltagem, intercalados a dessincronização cortical característica desta fase e, de espículas isoladas intercaladas ao ritmo teta hipocampal (Figura 12B).

Figura 8. Trechos de vigília atenta de animal não epiléptico (A) e epiléptico (B). (A): VA caracterizada pela presença de comportamento exploratório, com intensa movimentação da cabeça (C), *Rostrum* (R) e olhos (O) e acentuada dessincronização nas áreas corticais somestésicas. Note a modulação do ritmo teta hipocampal (sublinhado) concomitante com movimentação dos olhos. (B): VA de um animal epiléptico com as mesmas características descritas para o não epiléptico, porém, com presença de potenciais de baixa frequência e alta voltagem nas áreas corticais e, potenciais epileptiformes em ambas as áreas corticais e hipocampus. Note ritmo teta de baixa frequência (6Hz) durante a movimentação da cabeça e do *rostrum* (a); intrusão de espículas permeando a atividade teta hipocampal (b) e intensificação do comportamento exploratório no animal epiléptico (c). Abreviaturas: A3d-e: áreas somestésicas direita e esquerda. CA1d-e: hipocampo dorsal direito e esquerdo. C: Cabeça; R: *rostrum*, O: olhos. Calibração: 50 μ V/seg.

Figura 9. Trechos de vigília relaxada de animal não epilético (A) e epilético (B). (A): Atividade cortical e hipocampal mesclando padrões de sincronização e dessincronização concomitante com quiescência comportamental (a). Em (b) intensificação do alerta na vigília com o retorno do ritmo teta hipocampal concomitante com dessincronização cortical e movimentação de C, R e O. (B): Características eletrofisiológicas equivalentes as do animal não epilético entretanto, com atividade epileptiforme no hipocampo, ondas delta espiculadas e espículas isoladas na região cortical. Abreviaturas: A3d-e: áreas somestésicas direita e esquerda. CA1d-e: hipocampo dorsal direito e esquerdo. C: cabeça, R: *rostrum*, O: olhos. Calibração: 50 μ V/seg.

Figura 10. Trechos de sono sincronizado de animal não epilptico (A) e epilptico (B). (A): Reduo de atividade muscular e supresso do ritmo teta hipocampal com predomnio de atividade sincronizada no crtex e no hipocampo (ondas delta e fusos). (B): Note ondas delta espiculadas bem como espculas isoladas nas reas corticais e hipocmpais. Abreviaturas: A3d-e: reas somestsicas direita e esquerda. CA1d-e: hipocampo dorsal direito e esquerdo. C: cabea, R: *rostrum*, O: olhos. Calibrao: 50 μ V/seg.

Figura 11. Trechos de sono pré-paradoxal de um animal não epiléptico (A) e epiléptico (B). (A): sono pré-paradoxal caracterizado pela presença de fusos corticais concomitante com ritmo teta hipocampal e intensa redução de atividade muscular. (B): sono pré-paradoxal de um animal epiléptico com intrusão de atividade epileptiforme no hipocampo. Abreviaturas: A3d-e: áreas somestésicas direita e esquerda. CA1d-e: hipocampo dorsal direito e esquerdo. C: cabeça, R: *rostrum*, O: olhos. Calibração: 50 μ V/seg.

Figura 12. Trechos de sono dessincronizado no animal não epiléptico (A) e epiléptico (B). (A): Intensa dessincronização cortical concomitante com ritmo teta hipocampal. Note a modulação do ritmo teta expresso pelo aumento da voltagem e da frequência durante movimento de C e R, característico de episódio onírico. (B): Potenciais de baixa frequência e alta voltagem e atividade epileptiforme intercalados com períodos de intensa dessincronização na região cortical. Note presença de espículas na região hipocampal e completa ausência da modulação do ritmo teta durante atividade onírica. Abreviaturas: A3d-e: áreas somestésicas direita e esquerda. CA1d-e: hipocampo dorsal direito e esquerdo. C: cabeça, R: *rostrum*, O: olhos. Calibração: 50 μ V/seg.

4.2 Análises quantitativas

4.2.1: *Estudo do CVS e episódios oníricos*

Inicialmente, apresentaremos o estudo da duração total das fases do CVS seguido pela análise da distribuição das fases em função do ciclo claro e escuro. Após essas análises, serão expostas as análises da distribuição das fases do CVS em função dos períodos manhã, tarde, noite e madrugada. A mesma seqüência de exposição dos dados será adotada para as análises dos episódios oníricos.

4.2.1.1: Duração total de cada fase do CVS

Os animais epiléticos apresentaram diferenças significativas da duração total de algumas fases do CVS quando comparados ao grupo não epilético ($F_{4,36} = 2,71$; $p = 0,045$) (Tabela 1, Anexo A).

Foi evidenciada uma redução significativa de VA ($p < 0,001$) concomitante com aumento de SS ($p < 0,001$) no grupo portador de crises espontâneas, entretanto não houve alteração significativa para VR ($p = 0,88$), PP ($p = 0,83$) e SD ($p = 0,44$) (Figura 13).

Figura 13: Duração total de cada uma das fases do CVS em 22hs de registros contínuos de ratos não epiléticos e epiléticos. Abreviaturas: CVS: ciclo vigília-sono; VA: vigília atenta; VR: vigília relaxada; SS: sono sincronizado; PP: sono pré-paradoxal, SD: sono dessincronizado. NEPI: grupo não epilético; EPI: grupo epilético. * $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

4.2.1.2: Duração total das fases do CVS em função dos ciclos claro e escuro

Os animais epiléticos apresentaram alterações na duração total da maioria das fases do CVS ao longo do ciclo claro e escuro ($F_{4,36} = 4,66$; $p = 0,003$) (Tabela 2, Anexo A).

Os animais epiléticos apresentaram comportamento de vigília oposto ao padrão comportamental característico de ratos não epiléticos. Na fase clara, os animais epiléticos apresentaram aumento de VA ($p = 0,004$) sem alteração da VR ($p = 0,28$) (Figura 14A) ao passo que a noite apresentaram uma redução significativa ($p < 0,001$) de VA concomitante com aumento de VR ($p = 0,025$) (Figura 14B).

Em relação à duração das fases de sono, foi evidenciada uma significativa redução de SD ($p = 0,004$) durante o dia no grupo portador de crises espontâneas recorrentes. Embora o rato epilético tenha apresentado

inversão no comportamento permanecendo mais tempo acordado durante o dia e mais tempo dormindo a noite, esses animais também apresentaram (curtos) períodos de sono durante o ciclo claro ($p=0,041$) identificados pela análise estatística (Figura 14A). Ademais, no ciclo escuro houve uma maior concentração de SS ($p<0,001$) no grupo epiléptico quando comparado ao grupo não epiléptico (Figura 14B). Apesar de identificarmos um aumento de SD nos animais epilépticos durante a noite, a diferença entre os grupos não foi significativa, ($p=0,20$) (Figura 14B). Não foram observadas diferenças significativas de PP entre os grupos em ambos os ciclos claro e escuro ($p=0,99$ e $p=0,97$), respectivamente (Figura 14A-B).

Figura 14: Duração total de cada uma das fases do CVS em função do ciclo claro (A) e escuro (B). Abreviaturas: CVS: ciclo vigília-sono; VA: vigília atenta; VR: vigília relaxada; SS: sono sincronizado; PP: sono pré-paradoxal, SD: sono dessincronizado. NEPI: grupo não epilético; EPI: grupo epilético. * $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

4.2.1.3: Duração total das fases em função dos períodos

A análise estatística (MANOVA) revelou interação significativa ($F_{12,108} = 2,77$; $p = 0,002$) entre grupo, períodos e as fases, evidenciando o período do dia ou da noite no qual o grupo epilético apresentou as anormalidades na distribuição das fases do CVS (Tabela 3, Anexo A).

Embora a quantidade de VA ($p=0,10$) e VR ($p=0,74$) fosse similar entre os grupos durante a manhã (Figura 15A), os animais epiléticos apresentaram um aumento significativo de VA à tarde ($p<0,001$) sem diferenças significativas na duração da VR ($p=0,96$) (Figura 15B). Por outro lado, houve redução de VA durante todo o ciclo escuro ($p<0,002$) (Figura 15C-D), ao passo que a VR apresentou aumento significativo ($p=0,021$) apenas na primeira parte da noite (19:00-00:30) (Figura 15C), retornando a valores similares ao grupo não epilético durante a madrugada ($p=0,99$) (Figura 15D).

Além das diferenças nas fases de vigília, também foi identificado alterações nas fases de SS e SD. Enquanto, no grupo epilético, o SS era mais prevalente durante a manhã ($p<0,001$) as fases de PP ($p=0,98$) e SD ($p=0,87$) não apresentaram diferenças significativas (Figura 15A). No período da tarde, a distribuição de SS ($p=0,54$) e PP ($p=0,99$) foi similar entre grupos, no entanto, houve redução significativa de SD ($p=0,002$) nos animais epiléticos (Figura 15B). Ao contrário do padrão de ritmos biológicos existente em ratos não epiléticos, animais portadores de crises espontâneas recorrentes apresentaram um aumento significativo de SS durante todo o ciclo escuro ($p<0,005$) (Figura 15C-D). As fases de PP e SD não apresentaram diferenças significativas ($p>0,28$) durante o ciclo escuro (Figura 15C-D) quando comparadas ao grupo não epilético.

Figura 15: Duração total das fases do CVS em função dos períodos. A: período entre 07:00hs-12:30hs; B: período entre 12:30hs-18:00hs; C: 19:00hs-00:30hs; D: 00:30hs-06:00hs. Abreviaturas: Abreviaturas: CVS: ciclo vigília-sono; VA: vigília atenta; VR: vigília relaxada; SS: sono sincronizado; PP: sono pré-paradoxal, SD: sono dessincronizado. NEPI: grupo não epilético; EPI: grupo epilético. * $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

4.2.1.4 Estudo dos episódios oníricos

Os animais epiléticos não apresentaram alteração significativa na duração total dos episódios oníricos em um período total de 22 horas ($F_{1,10}=0,45$; $p=0,51$) (Figura 16, Tabela 4-Anexo B).

Figura 16: Duração total dos episódios oníricos entre os grupos de animais não epiléticos e epiléticos. Abreviaturas: NEPI: grupo não epilético; EPI: grupo epilético. * $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

As análises em função dos ciclos claro e escuro revelaram interação significativa entre grupo e ciclos ($F_{1,10} = 5,83$; $p = 0,036$) (Tabela 4, Anexo B), no entanto as significâncias encontradas foram apenas para a análise intra-grupo dos animais não epiléticos. O comportamento onírico nesse grupo foi caracterizado pela redução dos sonhos no ciclo escuro (Figura 15B), quando comparados ao claro ($p = 0,002$), ao passo que não houve alteração significativa em função dos ciclos no grupo epilético ($p = 0,34$) (Figura 15B). Não foi observada significância estatística *entre os grupos* epilético e não epilético em ambos os ciclos ($p > 0,42$) (Figura 17A-B).

Figura 17: Duração total dos episódios oníricos em função do ciclo claro (A) e escuro (B). Abreviaturas: NEPI: grupo não epiléptico; EPI: grupo epiléptico. [†] $p < 0,05$ v ciclo claro, grupo não epiléptico. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média:

As análises em função dos períodos revelaram alterações significantes ($F_{3,30} = 3,20$; $p = 0,037$), entretanto tais alterações foram identificadas apenas para as análises intra-grupo (Tabela 4, Anexo B). Os animais não epiléticos, apresentaram maior concentração do comportamento onírico no período vespertino, quando comparado a noite e madrugada ($p < 0,001$) (figura 18), ao passo que, no grupo epiléptico, os episódios oníricos se distribuíram de forma uniforme ao longo de todos os

períodos ($p>0,17$) (Figura 18). Não houve diferença estatística *entre os grupos* analisados em função dos períodos ($p>0,63$).

Figura 18: Duração total dos episódios oníricos em função dos períodos. Abreviaturas: NEPI: grupo não epilético; EPI: grupo epilético. [†] $p<0,05$ v *noite e madrugada, grupo não epilético*. Dados expressos em média± erro padrão da média:

4.2.1.5: Resumo dos valores estatísticos encontrados nas análises do CVS e episódios oníricos

Tabela 5: Quadro resumo dos valores estatísticos encontrados no estudo do ciclo vigília-sono e episódios oníricos.

	TOTAL	CC	CE	P1	P2	P3	P4
VA _{nepi} v VA _{epi}	$p<0,001^*$ (↓)	$p=0,004^*$ (↑)	$p<0,001^*$ (↓)	$p=0,10$	$p<0,001^*$ (↑)	$p=0,002^*$ (↓)	$p<0,001^*$ (↓)
VR _{nepi} v VR _{epi}	$p=0,88$	$p=0,28$	$p=0,025^*$ (↑)	$p=0,71$	$p=0,96$	$p=0,021^*$ (↑)	$p=0,99$
SS _{nepi} v SS _{epi}	$p<0,001^*$ (↑)	$p=0,041^*$	$p<0,001^*$ (↑)	$p<0,001^*$ (↑)	$p=0,54$	$p=0,005^*$ (↑)	$p=0,001^*$ (↑)
PP _{nepi} v PP _{epi}	$p=0,83$	$p=0,99$	$p=0,97$	$p=0,98$	$p=0,99$	$p=0,99$	$p=0,97$
SD _{nepi} v SD _{epi}	$p=0,44$	$p=0,004^*$ (↓)	$p=0,20$	$p=0,97$	$p=0,002^*$ (↓)	$p=0,99$	$p=0,28$
CO _{nepi} v CO _{epi}	$p=0,51$	$p=0,42$	$p=0,91$	$p=0,99$	$p=0,63$	$p=0,95$	$p=0,98$

Símbolos: (↓) redução significativa da variável no grupo epilético; (↑) aumento significativo da variável no grupo epilético. Abreviaturas: VA: vigília atenta; VR: vigília relaxa; SS: sono sincronizado; PP: sono pré-paradoxal; SD: sono dessincronizado; CO: comportamento onírico; CC: ciclo claro; CE: ciclo escuro; P1: manhã, P2: tarde; P3: noite; P4: madrugada. *nepi*: grupo não epilético; *epi*: grupo epilético.

4.2.2 Análise da seqüência natural das fases de sono e vigília

Na tentativa de se observar possíveis alterações na arquitetura dos CVS as quais poderiam resultar em fragmentação e, conseqüentemente, perda da eficiência do sono nos ratos epilépticos realizamos um estudo comparativo da microestrutura dos CVS e dos ciclos de sono por meio da análise da seqüência natural das fases VA→VR→SS→PP→SD e, SS→PP→SD nos dois grupos experimentais (Tabela 6, Anexo C).

O número de ciclos com seqüência regular da VA para o SD reduziu significativamente ($F_{1,47}=9.57$; $p=0.004$) (Figura 19) assim como os ciclos de sono ($F_{1,47}=9.87$; $p=0.003$) (figura 20) nos animais portadores de crises espontâneas recorrentes durante as 22 horas de registro. Não houve diferença estatística em função dos ciclos (claro e escuro) ($F_{1,23}<1,87$; $p=0,18$) e dos períodos ($F_{1,47}<1,34$; $p>0,28$) entre os grupos analisados (Tabela 6, Anexo C).

Figura 19: Distribuição do número de episódios de CVS completos (VA→SD) nos grupos não epiléticos e epiléticos. Períodos: 1: manhã; 2: tarde; 3: noite; 4: madrugada. Abreviaturas: NEPI: grupo não epilético; EPI: grupo epilético, CVS: ciclo vigília-sono * $p<0,05$

Figura 20: Distribuição do número de episódios de CS completos (SS→SD) nos grupos não epiléticos e epiléticos. Períodos: 1: manhã; 2: tarde; 3: noite; 4: madrugada. Abreviaturas: NEPI: grupo não epilético; EPI: grupo epilético; CS: ciclos de sono. * $p < 0,05$

4.2.4: Volume do Núcleo Supraquiasmático

Embora o animal epilético apresente uma significativa alteração em todo o CVS, o grupo portador de crises espontâneas recorrentes não apresentou diferença significativa no volume ($p=0,47$) do núcleo supraquiasmático, principal centro regulador do CVS nos mamíferos (figura 21). O volume expresso em mediana (percentil 25 e 75) foi de 9,009 (8,993 e 9,024) mm^3 e 9,059 (8,598 e 9,365) mm^3 para o grupo não epilético e epilético, respectivamente.

A

B

Figura 21: Foto ilustrativa de cortes coronais do núcleo supraquiasmático. A: animal não epilético; B: animal epilético. Note seta indicando localização exata do núcleo.

5. Discussão

Os resultados obtidos nesta pesquisa são muito densos, desafiando uma explicação simples, certamente devido à própria complexidade dos processos que geram a epilepsia e o sono. No caso da epilepsia provocada por pilocarpina esse aspecto tem sido extensamente estudado por (Cavalheiro *et al.* 1991; Mello *et al.*, 1993; Covolan e Mello, 2000; 2006; Longo e Mello, 1999; Longo *et al.*, 2002) tendo-se demonstrado a existência de lesões em múltiplas regiões do encéfalo em que há neurotransmissão colinérgica. Esse fato aqui mencionado aponta para um sério comprometimento de numerosas regiões do sistema nervoso central em ratos epiléticos, o qual pode estar alterando toda a regulação homeostática dos animais, assim como os ajustes vegetativos que fazem parte dos comportamentos.

A epilepsia, como já se sabe há muito tempo afeta numerosas funções. A arquitetura do ciclo vigília-sono, por exemplo, que compreende numerosos mecanismos em que não só os sistemas motores, mas também os vegetativos e psíquicos sofrem intensas alterações funcionais.

As relações entre sono e epilepsia são complexas e de grande relevância. A intrincada relação entre sono e epilepsia inclui os efeitos do sono nas crises epiléticas e nas descargas interictais e alterações da arquitetura do sono em pacientes epiléticos. As descargas generalizadas em geral aumentam em frequência durante o sono sincronizado e diminuem durante o dessincronizado (Broughton, 1990). Durante o sono

dessincronizado as descargas são raras e tem a aparência semelhante a da vigília.

Desde que Berger criou a eletroencefalografia no início da década de 30, seguida pelo desenvolvimento de inúmeros métodos de registros e de análises dos eletroscilogramas (registro de oscilações no tálamo, no hipocampo, bulbo entre outros) o estudo do sono e da epilepsia tem avançado significativamente. Atualmente é possível se diagnosticar as epilepsias com extrema precisão, além da investigação científica a respeito dos mecanismos de ação subjacentes a cada tipo de epilepsia.

Neste estudo, analisamos minuciosamente a arquitetura do ciclo vigília-sono de animais tornados epiléticos por pilocarpina. A investigação que possui riqueza nas particularidades em relação ao comportamento de sono e vigília nos revelou importantes aspectos desse ritmo biológico em ratos do modelo de crises parciais complexas.

O estudo eletrofisiológico e comportamental aqui realizado permite destacar sumariamente os seguintes aspectos, que serão discutidos a seguir:

- 1) As crises epiléticas ocorreram com maior frequência (58%) no ciclo claro;
- 2) Os animais adultos tornados epiléticos por pilocarpina apresentaram, no período crônico do modelo (60 dias após o SE), padrões eletroscilográficos e comportamentais que caracterizam todas as fases do ciclo vigília-sono.

- 3) Alterações no perfil eletrofisiológico das fases de vigília e sono foram identificadas no modelo de epilepsia por pilocarpina.
- 4) Ratos epilépticos apresentaram redução na duração total de VA concomitante com aumento de SS. No ciclo claro, houve sensível aumento de SS no período da manhã, seguido de aumento de VA e redução de SD durante à tarde. No ciclo escuro, foi evidenciada uma redução de VA concomitante com aumento de SS ao longo da noite. Ademais, houve aumento de VR na primeira metade da noite.
- 5) Os animais tornados epilépticos por pilocarpina apresentaram redução na alternância das fases de vigília atenta para sono dessincronizado, assim como nos ciclos de sono completos (SS, PP e SD).
- 6) Apesar de identificarmos uma redução significativa de SD nos animais epilépticos, não foi evidenciada alteração significativa na duração total dos comportamentos oníricos entre os dois grupos. Enquanto os animais não epilépticos apresentaram concentração desses eventos durante o período vespertino no ciclo claro, os epilépticos não apresentaram diferença quantitativa na sua distribuição ao longo dos ciclos claro e escuro.
- 7) Embora as análises tenham revelado alterações de suma importância nos padrões rítmicos dos ciclos vigília-sono não foi identificada nenhuma diferença no volume do núcleo supraquiasmático entre os grupos analisados.

5.1 Frequências das crises espontâneas recorrentes

Em relação ao estudo do perfil de ocorrência de crises espontâneas, nossos resultados demonstraram que as crises ocorrem com maior frequência durante o ciclo claro (58%), em especial durante o período vespertino (72,7%). Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Arida *et al.* (1999). Ao analisar dados obtidos a partir da monitorização de animais tratados com pilocarpina por aproximadamente 135 dias os autores demonstraram que a predominância das crises epiléticas era altamente significativa durante o período diurno. Esses autores apresentaram informações relevantes para a compreensão da distribuição das crises espontâneas em função dos ritmos circadianos no modelo de crises parciais complexas por pilocarpina. Recentemente, Goffin *et al.* (2007) submeteram animais tratados com pilocarpina a registros eletrofisiológicos desde a indução do *status epilepticus* e encontraram resultados similares ao do estudo anterior, com predominância de 66.9% das crises durante o período diurno.

Estudos têm demonstrado que a ocorrência das crises não é totalmente aleatória, entretanto pouco se é conhecido a respeito da interação entre epilepsia e ritmos biológicos (Hofstra e Weerd, 2008). Muitas investigações em modelos experimentais têm apresentado valiosas informações. Quigg *et al.* (2000a) realizaram um estudo de monitoramento das crises epiléticas em ratos, os quais foram expostos a duas condições: na primeira, os animais eram submetidos à alternância de ciclos claro e escuro (12/12hrs) e, na segunda à de escuro constante: os resultados

revelaram que a frequência das crises era maior no período claro em ambos os grupos mesmo após a retirada do estímulo externo (luz). Os autores sugeriram que as crises não são influenciadas exclusivamente pelos estímulos exógenos, podendo haver uma influência direta de um estímulo circadiano endógeno. Entre as hipóteses sugeridas por Quigg *et al.* (2000a), uma possível influência seria do núcleo supraquiasmático localizado no hipotálamo anterior. Sendo considerado o principal relógio biológico dos mamíferos, este núcleo é responsável pela geração e manutenção de diversos processos fisiológicos, como ciclo vigília-sono, temperatura corporal, pressão sanguínea, além da síntese e secreção de inúmeros hormônios, entre eles a melatonina e cortisol (Hofstra e Weerd, 2008).

Entretanto, a literatura tem apresentado dados conflitantes no que diz respeito à função núcleo supraquiasmático em animais do modelo da pilocarpina. Segundo os estudos de Stewart e Leung, 2003, não foram observadas alterações morfológicas no núcleo supraquiasmático em animais crônicos tratados com pilocarpina. Sanabria *et al.* (1998), no entanto demonstraram que ratos na fase crônica do modelo apresentavam expressão anormal de c-fos (genes de ativação imediata) no núcleo supraquiasmático quando submetidos a pulsos de luz durante o início da noite, demonstrando uma indubitável alteração na resposta a um estímulo externo. Tal achado sugere uma possível alteração funcional no principal relógio biológico a qual poderia resultar em disfunções nas ritmicidade biológica.

A interação epilepsia e ritmos circadianos é demasiadamente complexa para atribuímos à apenas um componente ou região do sistema nervoso central a responsabilidade pelo padrão cíclico de ocorrências das crises no modelo da pilocarpina. Conhecermos os mecanismos subjacentes da interação epilepsia e ritmos circadianos será fundamental para respondermos importantes questões tais como, em que momento e por qual razão uma crise eclodirá.

5.2 Presença de todas as fases do ciclo vigília-sono nos ratos epilépticos.

Os animais portadores de crises espontâneas recorrentes apresentaram todas as fases do CVS. Para discutirmos esse importante achado, citaremos algumas informações relevantes em relação à neurobiologia da vigília e sono e histopatologia de ratos tornados epilépticos por pilocarpina.

Inicialmente acreditava-se em regiões responsáveis pela manutenção da vigília e indução do sono, entretanto sabemos hoje que esses estados comportamentais dependem de uma complexa interação de vários sistemas neurais. Atualmente, sabe-se que os substratos neurais e químicos que regem tanto a vigília quanto o sono dependem da atividade recíproca dos grupos celulares que determinarão a alternância entre os comportamentos.

Desde a década de 50 é sabido que o sistema reticular ativador ascendente é de suma importância para a manutenção da ativação cortical e comportamento de vigília. Além desse sistema, encontramos atividade

neuronal no locus coeruleus (ponte), substância negra, neurônios colinérgicos da região pontino-mesencefálica, e atualmente sabe-se que o sistema hipotalâmico com suas respectivas interações participa desta dinâmica complexa (Aloe, 2005). Neurônios histaminérgicos e orexinérgicos localizados no hipotálamo posterior são ativados durante a vigília (Jones, 2005).

Neurônios localizados no prosencéfalo basal e região pré-óptica (hipotálamo) são indicados como estruturas promotoras de sono. Outras áreas podem ser ativadas seletivamente, incluindo locus coeruleus, que expressam proteína c-fos durante o sono (Maloney *et al.*, 2000). O tálamo contém neurônios gabaérgicos e acredita-se que seus padrões de disparo neuronal são responsáveis pela geração dos fusos de sono (Jones, 2005).

Não há apenas um neurotransmissor ou região responsável pela gênese do sono dessincronizado, mas se aceita que o mesmo tenha uma área de predominância: a região dorsal da formação reticular mesencefálica e pontina. Sugere-se a acetilcolina como principal neurotransmissor durante essa fase de sono (Kalia, 2005).

Tendo em vista essa complexa rede neural envolvida tanto em mecanismos de vigília como de sono, é de suma importância evidenciar as alterações morfológicas observadas no modelo experimental utilizado nessa pesquisa.

Estudos morfológicos dos tecidos de animais submetidos ao modelo da pilocarpina revelaram morte neuronal em diferentes áreas do encéfalo. As regiões hipocâmpais (CA1 e CA3) e giro denteado são as mais afetadas,

seguido do núcleo accubens, amígdala, córtex entorrinal, piriforme e temporal ventral (Covolan e Melo, 2006). Recentemente, Peredery *et al.* (2000) analisou mais de 100 estruturas do sistema nervoso central de animais tratados com lítio e pilocarpina, demonstrando perda neuronal significativa na substância negra reticulata e núcleos paratenial e reunies do tálamo. Da mesma forma, a gênese de novas estruturas também é um importante fator observado no modelo da pilocarpina, como por exemplo, o aumento de expressão da proteína glial fibrilar ácida no hipocampo, tálamo, amígdala e neocórtex de ratos com 60 dias *pós status epilepticus* (Garzillo e Mello, 2002).

Covolan e Mello em 2000 demonstraram que 8 horas após SE, ratos submetidos ao modelo da pilocarpina, apresentaram lesões na região hipotalâmica, entretanto após 24 horas não foi encontrada nenhuma alteração significativa.

Tendo em vista a complexidade da geração do ritmo vigília-sono concomitante com as lesões histopatológicas encontradas no modelo da pilocarpina, aventamos a hipótese de que ao longo de todo o processo epileptogênico característico do modelo (períodos silente e crônico) estruturas de suma importância para o ciclo vigília-sono tenham sofrido a influência deletéria do *status epilepticus* resultante da injeção de pilocarpina. Porém, ao longo do período para o estabelecimento do modelo, essas alterações estruturais tenham sido recuperadas ou, ainda, as funções tenham sido assumidas por outros centros de vigília e hipnogênicos. De fato, experimentos realizados há vários anos em nosso Laboratório (Assumpção,

1974; Confessor, 1988) mostraram que lesões eletrolíticas e neurotóxicas uni e bilaterais na formação reticular mesencefálica - estrutura fundamental para a geração da vigília – levam, inicialmente, a uma condição comatosa no hemisfério cerebral referente ao lado da lesão no mesencéfalo, a qual é substituída, uma semana após a lesão, por dessincronização durante a vigília atenta e sono dessincronizado e sincronização durante o sono sincronizado. Análises anatomopatológicas das regiões mesencefálicas demonstraram completa remoção e reorganização estrutural das áreas lesadas, muito embora o animal tivesse recuperado os padrões eletrofisiológicos com alternância das fases e ciclagem natural entre vigília e sono. Aventou-se a hipótese de que outros centros, provavelmente, hipotalâmicos assumiram essa função dada à importância da integridade do ciclo vigília-sono para a vida da maioria das espécies.

5.3 Caracterização das fases de vigília e sono

As análises visuais nos permitiram identificar diferenças no perfil eletrofisiológico dos animais epiléticos: 1) a presença de espículas em todas as regiões analisadas e em todos os estágios do ciclo vigília-sono; 2) ondas delta mescladas com espículas; 3) intrusão de ondas de baixa frequência e alta amplitude no córtex durante trechos predominantemente dessincronizados.

A presença de espículas é um achado inquestionável em relação à condição epilética a qual o animal se encontra. As espículas detectadas em ambas as regiões sugerem que esses potenciais anômalos são gerados em

estruturas presumivelmente, de origem mesial temporal (Cavalheiro *et al.*, 1991; Longo *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2003). O padrão atípico encontrado nas ondas delta reflete o possível efeito facilitador do sono sincronizado, para a eclosão das crises, uma vez que os eventos paroxísticos ocorrem comumente durante essa fase de sono na maioria das síndromes epiléticas (Malow, 2005). Acredita-se que a sincronização generalizada presente na fase NREM poderia potencializar a propagação de respostas pós-sinápticas (incluindo descargas epileptógenas), concomitante com o tônus muscular que facilitaria os movimentos estereotipados presentes na maioria das crises epiléticas (Shouse *et al.*, 2000).

É importante ressaltar algumas características eletrofisiológicas identificadas na vigília atenta e no sono dessincronizado de ratos tratados com pilocarpina. Desde os estudos pioneiros de Timolária *et al.* (1970) o quais introduziram o rato como o animal de escolha para o estudo do ciclo vigília-sono, está bem estabelecido que as fases de vigília atenta e de sono dessincronizado são caracterizadas eletrofisiologicamente por intensa dessincronização cortical e pela prevalência de ondas teta no hipocampo (Timolária *et al.*, 1970; Valle *et al.*, 1992, 1995). Os animais tratados com pilocarpina, entretanto, apresentaram alguns componentes eletrofisiológicos atípicos expressos como espículas e ondas lentas de alta voltagem, interpostos a dessincronização. Uma provável hipótese é que estruturas responsáveis pela geração e manutenção da dessincronização possam ter sofrido algum tipo de lesão causada pelo *status epilepticus* e como consequência, haveria um desequilíbrio na regulação de centros

sincronizadores os quais liberariam a ocorrência de ondas sincronizadas no córtex. Corroborando com essa hipótese há os achados histopatológicos característicos do modelo experimental de epilepsia do lobo temporal (Turski *et al.*, 1983; Priel *et al.*, 1996, Covolan e Melo, 2000, 2006) os quais apresentam lesões difusas no sistema nervoso central após *status epilepticus* induzido por pilocarpina. Ademais, recentemente, Sanabria *et al.* (2002) identificaram lesões corticais nos encéfalos de animais epiléticos no modelo da pilocarpina. O córtex somestésico apresentou alterações nas camadas mais superficiais (II-IV) comparado ao grupo não epilético. Devemos destacar que a área cortical analisada no presente estudo era o córtex somestésico, e presumivelmente as anormalidades encontradas durante o eletroscilograma na vigília atenta e do sono dessincronizado, se deva, pelo menos em parte, a essa alteração patológica detectada em animais com crises espontâneas. Entretanto, apenas com um estudo mais abrangente, considerando as diferentes áreas corticais e subcorticais concomitantemente propiciaria informações conclusivas sobre os prováveis centros envolvidos nas disfunções encontradas no presente estudo.

5.4 Efeitos da epilepsia no ciclo vigília-sono

É importante ressaltar um dos nossos principais achados neste estudo. A alteração na duração total das fases de VA e SS corroboram com a hipótese citada anteriormente de que estruturas responsáveis pela geração e manutenção da dessincronização possam ter sofrido algum tipo de lesão causada pelo *status epilepticus* e como consequência, haveria um

desequilíbrio na alternância entre estágios predominantemente sincronizados e dessincronizados.

Os ratos assim como a maioria dos roedores são animais de hábitos noturnos. Por possuírem um grande número de predadores esses animais procuram se esquivar do perigo elaborando e executando a maior parte dos comportamentos para a manutenção da espécie durante a noite, reservando o período do dia para dormirem.

Em relação às análises em função dos ciclos (claro e escuro), os animais epiléticos apresentaram uma resposta diametralmente oposta aos não epiléticos em ambos os ciclos revelando, dessa forma, certa indiferença aos estímulos externos.

Informações externas, como a presença ou ausência da luz são transmitidas ao núcleo supraquiasmático por meio do trato retino-hipotalâmico, resultando na modulação dos ritmos circadianos, incluindo o ritmo vigília-sono (Quigg, 2000b). Entretanto sabe-se que, outras vias aferentes, como as originadas do sistema límbico (hipocampo ventral, córtex entorrinal lateral, região amígdalo-hipocampal e amígdalo-piriforme) apresentam projeções para núcleo supraquiasmático (Krout *et al.*, 2002).

Vale ressaltar que determinadas áreas como amígdala, e principalmente região hipocampal estão comprometidas no animal crônico do modelo da pilocarpina (Turski *et al.*, 1983), nos levando a conjecturar a hipótese de possíveis lesões em vias aferentes que se projetam para o núcleo supraquiasmático. Para corroborar com a hipótese de lesão neuronal e/ou funcional na região hipotalâmica, animais epiléticos portadores de

crises espontâneas recorrentes apresentaram alterações na densidade neuronal nas regiões pré-óptica e hipotalâmica medial dorsal, áreas sabidamente relacionadas ao ciclo vigília-sono (Quigg *et al.*, 1999; Chou *et al.*, 2003; Bastlund *et al.*, 2005).

Tomadas em conjunto todas as evidências acima concomitantes com os resultados apresentados, sugerem uma possível disfunção do núcleo supraquiasmático e suas conexões hodológicas, na expressão do ritmo vigília-sono.

Por meio do método adotado em nosso Laboratório para a quantificação dos padrões eletroscilográficos, foi possível caracterizar minuciosamente a distribuição das fases de vigília e sono nos animais portadores de crises espontâneas recorrentes. O grupo epiléptico apresentou maior concentração de SS no início do dia, período no qual os animais não epiléticos, normalmente, apresentam curtos períodos de vigília com comportamentos exploratórios ao serem expostos a luz. O grupo de animais epiléticos mostrou-se indiferente a resposta ambiental, permanecendo nos estágios de sono mesmo após a troca do ciclo escuro para o claro. A alteração no padrão cíclico nos ratos epiléticos é indubitável uma vez que durante o período vespertino (período o qual se espera uma concentração maior de estágios de sono), o animal epiléptico apresentou aumento de vigília com redução de sono dessincronizado, ao passo que no ciclo escuro, os epiléticos apresentaram alteração nos comportamentos de vigília atenta e sono sincronizado.

Não obstante a alteração no ritmo vigília-sono, também foi identificada anormalidades na alternância de fases com seqüências regulares de vigília para sono em ratos tornados epilépticos por pilocarpina.

Poucos estudos em modelos experimentais foram realizados na tentativa de elucidar as interrelações entre epilepsia e sono. Raol e Meti (1998) analisaram o perfil do sono em animais submetidos à técnica de abrasamento e revelaram alterações fisiológicas a curto e médio prazo. Animais com crises secundariamente generalizadas apresentaram, a curto prazo, um aumento de SS e SD com diminuição de VR. A médio prazo, os dados revelaram apenas aumento de SS até 14^a dia de análise. Em contrapartida, Bastlund *et al.*(2005) demonstraram alterações no sono após 15 semanas do *status epilepticus* em ratos submetidos à estimulação elétrica hipocampal. As análises de sono durante a primeira parte do dia revelaram redução de SD em animais crônicos. Tal discrepância entre os resultados poderia ser explicada pela diferença nos protocolos utilizados. Raol e Meti (1998) analisaram o efeito agudo ocasionado pela crise epiléptica, enquanto que Bastlund *et al.* (2005) estudaram o efeito crônico causado pela epilepsia.

Nossos resultados corroboram e complementam as análises realizadas por Bastlund *et al.*(2005), uma vez que, demonstramos minuciosamente o efeito da epilepsia no sono ao longo do ciclo claro e escuro, evidenciando além da redução de SD, importantes alterações no sono sincronizado.

Os nossos achados corroboram também com os estudos clínicos. Bazil *et al.* (2000) demonstraram que pacientes portadores da epilepsia do lobo temporal apresentam redução de sono dessincronizado mesmo que as crises epiléticas não tenham sido eclodidas durante os estágios de sono. Quando os pacientes eram acometidos por crises noturnas, as alterações eram ainda mais acentuadas, além da redução do sono dessincronizado, algumas fases do sono sincronizado também eram afetadas pela crise epilética. De Almeida *et al.* (2003) demonstraram redução na porcentagem do sono dessincronizado, fragmentação do sono, aumento do número de mudanças de estágios e do tempo acordado após o início do sono em pacientes epiléticos com presença de esclerose hipocampal.

Em suma, as análises apresentadas do nosso estudo até o momento, demonstram uma total desorganização do ritmo vigília-sono nos animais epiléticos. Uma provável explicação para tais achados é que a epilepsia e as crises epiléticas poderiam afetar as inúmeras conexões ligadas ao núcleo supraquiasmático, que por sua vez alteraria os ritmos biológicos. Para corroborar com essa hipótese, Bazil *et al.*, (2000b) observaram redução significativa no nível de melatonina no período inter-ictal em pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal, quando comparados ao grupo sadio, entretanto, após uma crise convulsiva o nível de melatonina aumentava drasticamente. Ademais, modelos animais de epilepsia revelaram alterações nos ritmos da temperatura corporal quando submetidos à temperatura constante e possivelmente essas anormalidades estão ligadas a uma lesão hipotalâmica (Quigg *et al.*, 1999).

5.5 Efeitos da epilepsia no comportamento onírico

Nossos resultados demonstraram que não houve alteração na duração total dos comportamentos oníricos durante o sono dessincronizado no grupo epiléptico.

É de suma importância destacar que, segundo hipótese corrente em nosso Laboratório, a gênese dos sonhos começa com a revocação de múltiplas informações memorizadas que são analisadas e se combinam, resultando em um padrão neural específico (configuração do sonho). A identificação da configuração por processo consciente constitui o sonho. Quando a informação é identificada pelo processo consciente, gera-se um comportamento específico (um padrão onírico, constituído de componentes motores e vegetativos correspondentes). O comportamento específico é normalmente relacionado ao conteúdo do sonho, o qual pode ser expresso pela movimentação isolada ou concomitante dos vários segmentos do corpo do animal (Valle, 1995). Vale ressaltar a riqueza de informações que a nossa técnica de abordagem experimental sobre sonhos possibilita, a qual pode gerar conhecimentos que corroborem para o esclarecimento dos mecanismos relacionados à revocação e à consolidação das informações durante o sono dessincronizado.

Um estudo realizado por Wetzell *et al.* (2003), demonstrou uma melhora na consolidação da memória de ratos que foram submetidos experimentalmente a um aumento do sono dessincronizado. No entanto, até o presente momento há inúmeras controvérsias sobre a real contribuição do

sono sincronizado e dessincronizado nos processos de memorização (Steriade e Timofeev, 2003; Wetzel *et al.*, 2003).

Os ratos submetidos ao modelo da pilocarpina no período crônico apresentaram um déficit significativo de aprendizado com piora na retenção de memória espacial quando comparados ao grupo não epilético (Leite *et al.*, 1990, Dos Santos *et al.*, 2005).

Do ponto de vista fisiológico, os resultados apresentados em relação aos sonhos são complexos para serem explicados, uma vez que não se sabe ao certo a função do sono dessincronizado na consolidação de memória da memória e qual a correlação entre aprendizado e comportamentos oníricos nos ratos epiléticos.

5.6 Núcleo supraquiasmático

Apesar das inúmeras alterações evidenciadas na ciclicidade dos animais epiléticos, os ratos portadores de crises espontâneas recorrentes não apresentaram diferença no volume do núcleo supraquiasmático, quando comparados aos animais não epiléticos. Nossos dados corroboram com análises histológicas qualitativas prévias realizadas pelo método de abrasamento (Quigg *et al.*, 1999) e da pilocarpina (Stewart e Leung , 2003) em animais portadores de epilepsia.

O núcleo supraquiasmático é uma estrutura anatômica localizada no hipotálamo anterior, acima do quiasma óptico. Esse núcleo representa o principal relógio biológico dos mamíferos, capaz de gerar um ritmo endógeno

próprio, passível de sincronização com o meio externo (Quigg, 2000b; Aloe *et al.*, 2005).

A técnica tradicional de análise morfológica é muito utilizada nas análises comparativas quando as alterações estruturais são muito evidentes, entretanto quando as anormalidades são discretas, a análise qualitativa poderia mascarar algum aspecto sutil que diferenciase os grupos estudados. Para situações como esta, a estereologia é recomendada. Essa técnica possibilita uma análise quantitativa, sem a subjetividade inerente ao método qualitativo (Shimitz e Hof, 2005).

Um dos parâmetros estereológicos (volume) foi utilizado no presente estudo para verificarmos possíveis alterações no núcleo supraquiasmático entre os grupos. Vale ressaltar que apesar da ausência de alterações estruturais macroscópicas, demonstrada nesse estudo, não foi realizada uma contagem neuronal que poderia revelar de forma mais detalhada possíveis alterações estruturais, no núcleo supraquiasmático de ratos tornados epilépticos por pilocarpina.

Creemos que, distúrbios funcionais do núcleo supraquiasmático (Sanabria *et al.*, 1996) poderiam ser, em parte, responsáveis pela alteração na ciclicidade dos estágios de vigília e sono descritos neste estudo, entretanto até o momento não sabemos ao certo, se existe alguma alteração na quantidade de neurônios no núcleo supraquiasmático dos ratos tornados epilépticos por pilocarpina. Um estudo abrangente combinando técnicas estereológicas e imuno-histoquímicas nas várias estações hodológicas do núcleo supraquiasmático após injeção de pilocarpina poderia auxiliar na

elucidação das questões relacionadas as alterações encontradas no ciclo vigília-sono e, se essas alterações são devido a distúrbios funcionais e/ou, estruturais no principal centro regulador de ritmos circadianos nos mamíferos.

6. Conclusão

Os dados obtidos no presente estudo demonstraram uma patente desorganização das fases de vigília e sono nos ratos tornados epiléticos por pilocarpina, ressaltando o efeito deletério da epilepsia *per se* em um dos ritmos circadianos mais importante nos mamíferos, o ciclo vigília-sono. Aventamos algumas hipóteses para tais achados: alteração funcional e/ou estrutural no núcleo supraquiasmático e suas conexões hodológicas; lesão em áreas responsáveis pela dessincronização e, a própria condição epilética poderiam ser responsáveis pelas disfunções observadas nos ciclos vigília-sono dos animais epiléticos deste estudo. Os resultados obtidos no presente estudo reproduziram anormalidades encontradas no ciclo vigília-sono observadas em pacientes epiléticos, sugerindo que o presente modelo pode ser uma importante ferramenta para o estudo de mecanismos subjacentes à epilepsia do lobo temporal e sono.

7. Anexos

Anexos A

Tabelas referentes às distribuições das fases do ciclo vigília-sono

Tabela 1 – Duração total (s) dos estágios de vigília e sono.

CVS	NEPI	EPI
VA	34981,23±606,88	32361,64±850,91*
VR	6607,59±588,98	7041,64±547,87
SS	29886,12±886,56	33483,59±1272,29*
PP	2257,71±407,80	1839,31±225,38
SD	6556,94±881,96	5922,31±440,58

Abreviaturas: CVS: ciclo vigília-sono; NEPI: grupo não epilético; EPI: grupo epilético; VA: vigília atenta; VR: vigília relaxada; SS: sono sincronizado; PP: sono pré-paradoxal, SD: sono dessincronizado. *p<0,05 v grupo não epilético. Dados expressos em média ± erro padrão da média.

Tabela 2 – Duração total (s) dos estágios de vigília e sono em função dos ciclos claro e escuro.

	CICLO CLARO		CICLO ESCURO	
	NEPI	EPI	NEPI	EPI
VA	11116,83±561,42	12730,93±727,87*	23864,39±654,23	19630,71±1094,35*
VR	3931,123±430,09	3384,807±237,35	2676,47±268,88	3656,83±349,21*
SS	19733,52±589,17	20557,75±680,27*	10152,6±587,24	12925,83±1090,67*
PP	1519,844±290,91	1266,136±169,32	737,87±147,72	573,1764±1227,71
SD	4772,715±674,34	3369,186±280,46	1784,22±284,16	2553,13±422,41

Abreviaturas: NEPI: grupo não epilético; EPI: grupo epilético; VA: vigília atenta; VR: vigília relaxada; SS: sono sincronizado; PP: sono pré-paradoxal, SD: sono dessincronizado. *p<0,05 v grupo não epilético. Dados expressos em média ± erro padrão da média.

Tabela 3 – Duração total (s) dos estágios de vigília e sono em função dos períodos

	MANHÃ		TARDE		NOITE		MADRUGADA	
	NEPI	EPI	NEPI	EPI	NEPI	EPI	NEPI	EPI
VA	6659,11±463,68	6512,69±579,51	4457,71±291,41	6218,23±601,78*	12844,59±508,13	10703,93±508,60*	11019,8±650,79	8926,77±966,06*
VR	1993,76±336,28	1625,58±107,92	1937,35±177,08	1759,22±182,77	1165,15±189,06	1991,58±161,00*	1511,31±106,10	1665,25±239,19
SS	8678,52±369,36	9713,97±362,13*	11054,99±495,31	10843,78±548,42	4542,14±353,20	5856,66±512,51*	5610,45±594,12	7069,16±808,39*
PP	576,43±141,85	501,86±98,92	943,40±160,23	764,27±87,91	399,50±113,06	219,65±51,14	338,36±86,18	353,51±116,99
SD	1793,19±393,99	1529,58±318,81	2979,51±305,76	1839,60±126,25*	813,46±182,11	995,41±113,26	970,76±219,24	1557,72±344,44

Abreviaturas: NEPI: grupo não epilético; EPI: grupo epilético; VA: vigília atenta; VR: vigília relaxada; SS: sono sincronizado; PP: sono pré-paradoxal, SD: sono dessincronizado. *p<0,05 v grupo não epilético. Dados expressos em média ± erro padrão da média.

Anexo B

Tabela referente à distribuição dos comportamentos oníricos

Tabela 4 – Duração total (s) dos episódios oníricos em 22 horas, em função dos ciclos claro e escuro e dos períodos.

	NEPI	EPI
TOTAL	1616,56±212,37	1387,86±265,11
CC	1213,34±188,66	831,91±140,60
CE	403,22±62,56 [†]	555,95±151,29
P1	474,80±152,00	399,66±93,26
P2	738,54±87,91 [†]	432,24±63,70
P3	194,33±55,25	199,54±49,51
P4	208,89±46,55	356,41±106,50

Abreviaturas: NEPI: grupo não epilético; EPI: grupo epilético; TOTAL: compreende 22 horas de registro; CC: ciclo claro; CE: ciclo escuro; P1: manhã; P2: tarde; P3: noite; P4: madrugada. [†] p<0,05 v ciclo claro, grupo não epilético; [‡] p<0,05 v noite e madrugada, grupo não epilético. Dados expressos em média ± erro padrão da média.

Anexo C

Tabelas referentes às distribuições de ciclos com sequência regular

Tabela 6: Número de episódios de ciclos regulares e ciclos de sono completos.

	CICLOS REGULARES		CICLOS DE SONO COMPLETOS	
	NEPI	EPI *	NEPI	EPI *
TOTAL	28,83±6,20	13,5±3,54	63,5±5,23	38,5±8,39
CC	20±4,95	8,33±1,82	43,33±3,58	25,33±5,50
CE	8,83±1,60	5,16±1,99	20,16±2,44	13,16±3,93
P1	8,5±2,95	4,5±1,73	15,67±3,49	10,67±2,87
P2	11,5±2,36	3,83±1,56	27,67±2,75	14,67±4,03
P3	2,83±0,48	2±0,89	8,17±1,49	4,67±1,78
P4	6±1,46	3,16±1,3	12±2,30	8,5±2,90

Ciclos regulares: compreendem da vigília atenta ao sono dessincronizado. Ciclos de sono completos: presença de todas as fases de sono. Abreviaturas: NEPI: grupo não epilético; EPI: grupo epilético; TOTAL: compreende 22 horas de registro; CC: ciclo claro; CE: ciclo escuro; P1: manhã; P2: tarde; P3: noite; P4: madrugada. * $p < 0,05$ v grupo não epilético na duração total (22 horas de registro). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

Anexo D

Implante de elétrodos subcorticaes Averiguação da posição dos elétrodos

Figura 21: Foto ilustrativa da posição dos elétrodos subcorticaes na região hipocampal. A: rato não epiléptico. B: rato epiléptico.

8. Referências

- Aloe F, Amzica F, Hening W, Menna-Barreto L, Pinto LR Jr, Velluti R, Vertes R, Timo-laria C. The brain decade in debate: VII. Neurobiology of sleep and dreams. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34(12):1509-19.
- Aloe F, Azevedo AP, Hasan R. Sleep-wake cycle mechanisms. *Rev Bras Psiquiatr.* 2005;27 (Supl 1):33-9.
- Alves RSC. *Estudo eletrofisiológico do sono e de crises epiléticas em ratos tratados com ácido domóico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.
- Andersen ML. Estudos dos estados e fases do sono em ratos. In: Tufik S., editor. *Sono. Aspectos Básicos*. São Paulo, Universidade Federal de São Paulo: Instituto do Sono; 2000. p. II1-II13.
- Andersen ML, Valle AC, Timo-laria C, Tufik S. *Implantação de eletrodos para o estudo eletrofisiológico do ciclo vigília-sono do rato*. São Paulo: CLR Balieiro Editores Ltda; 2001. p.3-34.
- André, ES, Bruno-Neto R, Pellarin L, Silva LF, Valle AC, Timo-laria C. Electrophysiological characterization of a new form of spontaneous epilepsy in wistar rats. *Epilepsia.* 1999; 40:131-2. (Presented at XXIII International Epilepsy Congress; 1999; Praga, Czech Republic.)
- André ES. *Estudo quantitativo das fases do ciclo vigília-sono e de suas relações com crises epiléticas em ratos Wistar com uma nova forma de epilepsia espontânea do tipo ausência* [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2002.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos, Conceitos Técnicos. [Internet]. 10 de Maio de 2009 [citado 12 de maio de 2009]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/conceito.htm>
- Arida RM, Scorza FA, Peres CA, Cavalheiro EA. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res.* 1999; 34(2-3):99-107.
- ASA- American Sleep Association. *What is Sleep?* [Internet]. 2008 Jun 10 [cited 2008 Jun 11]. Available from: <http://www.sleepassociation.org/index.php?p=whatissleep>.
- ASA- American Sleep Association. *Narcolepsy/Cataplexy*. [Internet]. 2009 May 25 [cited 2009 May 26]. Available from: <http://www.sleepassociation.org/index.php?p=aboutnarcolepsy>

- Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*. 1953;118 (3062):273-4.
- Assumpção JA. *Mecanismos de Recuperação do Alerta Em Ratos Com Lesão da Formação Reticular* [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1974.
- Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience*. 1991; 42(2):351-63.
- Babb TL, Pretorius JK, Mello LE, Mathern GW, Levesque MF. Synaptic reorganizations in epileptic human and rat kainate hippocampus may contribute to feedback and feedforward excitation. *Epilepsy Res Suppl*. 1992;9:193-202
- Baccalá LA, Sameshima K. Partial directed coherence: a new concept in neural structure determination. *Biol Cybern*. 2001;84 (6):463-74.
- Bal T, McCormick DA. What stops synchronized thalamocortical oscillations? *Neuron*. 1996;17(2):297-308.
- Baraldo M. The influence of circadian rhythms on the kinetics of drugs in humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(2):175-92.
- Bastlund JF, Jennum P, Mohapel P, Penschuck S, Watson WP. Spontaneous epileptic rats show changes in sleep architecture and hypothalamic pathology. *Epilepsia*. 2005;46(6):934-8.
- Bazil CW, Walczak TS. Effects of sleep and sleep stage on epileptic and nonepileptic seizures. *Epilepsia*. 1997; 38(1):56-62.
- Bazil CW, Castro LHM, Walczak TS. Reduction of Rapid Eye Movement Sleep by Diurnal and Nocturnal Seizures in Temporal Lobe Epilepsy. *Arch Neurol*. 2000a; 57(3):363-8.
- Bazil CW, Short D, Crispin D, Zheng W. Patients with intractable epilepsy have low melatonin, which increases following seizures. *Neurology*. 2000b; 55(11):1746-8.
- Bazil CW. Sleep and Epilepsy: Something Else We Did Not Know. *Epilepsy Curr*. 2003;3(2):48-9.
- Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1985;14(2):375-403.

- Billard M. Epilepsy and the sleep-wake cycle in man. In: Sterman MB, Shouse MN, Passouant P, editors. *Sleep and Epilepsy*. New York: Academic Press; 1982. p. 269-272.
- Bittencourt LRA. Tratamento clínico da Síndrome da Apnéia Obstrutiva do Sono. In: Bittencourt LRA, editora. *Diagnóstico e tratamento da síndrome da apnéia obstrutiva do sono (SAOS): guia prático*. São Paulo: Livraria Médica Paulista; 2008. p. 57-68.
- Bixler EO, Kales A, Vela-Bueno A, Jacoby JA, Scarone S, Soldatos CR. Nocturnal myoclonus and nocturnal myoclonic activity in the normal population. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1982;36(1):129-40.
- Bonanni E, Galli R, Maestri M, Pizzanelli C, Fabbrini M, Manca ML, Iudice A, Murri L. Daytime sleepiness in epilepsy patients receiving topiramate monotherapy. *Epilepsia*. 2004;45(4):333-7.
- Braun AR, Balkin TJ, Wesenten NJ, Carson RE, Varga M, Baldwin P, Selbie S, Belenky G, Herscovitch P. Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle. An H₂(15)O PET study. *Brain*. 1997;120 (Pt 7):1173-97.
- Broughton RJ, Guberman A, Roberts J. Comparison of the psychosocial effects of epilepsy and narcolepsy/cataplexy: a controlled study. *Epilepsia*. 1984;25(4):423-33.
- Broughton, R.J. Sleep and sleep deprivation studies in epilepsy. In: Wada JA, Ellingsen RJ, editors. *Clinical neurophysiology of epilepsy, EEG handbook (revised series)*. 4a ed. Amsterdam: Elsevier; 1990. p.89-119.
- Bruno-Neto R., André, ES, Pelarin, L. , Hilário, FK, Valle A C , Timolária C. *Caracterização de uma forma de epilepsia espontânea em ratos Wistar.*. (Presented at XIV FESBE; 1999a; Águas de Lindóia, Brasil. Abstracts).
- Bruno-Neto, R., André, ES, Pelarin, L. , Hilário, FK, Valle A C , Timolária C. *Prevalência de crises epiléticas espontâneas durante o ciclo vigília-sono de ratos Wistar.* (Presented at XIV FESBE; 1999b; Águas de Lindóia, Brasil. Abstracts).
- Bruno-Neto R, André ES, Valle AC, Timo-laria C. *Eficácia de drogas anti-epiléticas contra as crises de ausência espontâneas em ratos Wistar.* (Presented at XVI FESBE; 2001a; Águas de Lindóia, Brasil. Abstracts).

- Bruno-Neto R, André ES, Valle AC, Timo-laria C. *Efeitos da carbamazepina sobre as crises epilépticas de um novo modelo de epilepsia espontânea de ausência em ratos Wistar*. (Presented at XVI FESBE; 2001b; Águas de Lindóia, Brasil. Abstracts).
- Bruno-Neto, R. *Caracterização de uma nova forma de epilepsia espontânea em ratos Wistar*. [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2002.
- Burr W, Stefan H, Penin H. Epileptic activity during sleep and wakefulness. *Eur Neurol*. 1986; 25 (Supl 2):141-5.
- Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. 1991; 32(6):778-82.
- Cavalheiro EA, Fernandes MJ, Turski L, Mazzacoratti MG. Neurochemical changes in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res Suppl*. 1992; 9 :239-47.
- Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci*. 1995; 16(1-2):33-7.
- Cheixas-Dias A. *Correlação entre potenciais eletroencefalográficos do tipo espícula-onda lenta e desempenho em tarefa de direcionamento de atenção de ratos Wistar* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.
- Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci*. 2003;23(33):10691-702.
- COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos para o uso de animais de laboratório. [Internet]. 6 de maio de 2009 [citado 9 de maio de 2009]. Disponível em: [http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Princípios Éticos](http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Princípios%20Éticos).
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1981; 22(4):489-501.
- Confessor Y Q. *Recuperação do alerta em ratos com lesões da formação reticular mesencefálica provocadas por neurotoxinas* [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal Paulista; 1988.

- Cortesi F, Giannotti F, Ottaviano S. Sleep problems and daytime behavior in childhood idiopathic epilepsy. *Epilepsia*. 1999; 40(11):1557-65.
- Covolan L, Mello LE. Assessment of the progressive nature of cell damage in the pilocarpine model of epilepsy. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39(7):915-24.
- Covolan L, Mello LE. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res*. 2000; 39(2):133-52.
- Crespel A, Baldy-Moulinier M, Coubes P. The relationship between sleep and epilepsy in frontal and temporal lobe epilepsies: practical and physiopathologic considerations. *Epilepsia*. 1998; 39(2):150-7.
- Crespel A, Coubes P, Baldy-Moulinier M. Sleep influence on seizures and epilepsy effects on sleep in partial frontal and temporal lobe epilepsies. *Clin Neurophysiol*. 2000; 111 (Suppl 2):54-9.
- Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*. 2008;172(2):143-57
- Dahl M, Dam M. Sleep and epilepsy. *Ann Clin Res*. 1985; 17(5):235-42.
- de Almeida CA, Lins OG, Lins SG, Laurentino S, Valença MM. Sleep disorders in temporal lobe epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr*. 2003; 61(4):979-87.
- Declerck AC. Interaction sleep and epilepsy. *Eur Neurol*. 1986; 25 (Suppl 2):117-27.
- Degen R, Degen HE. Sleep and sleep deprivation in epileptology. *Epilepsy Res Suppl*. 1991; 2:235-60.
- Derry CP, Duncan JS, Berkovic SF. Paroxysmal motor disorders of sleep: the clinical spectrum and differentiation from epilepsy. *Epilepsia*. 2006; 47(11):1775-91.
- Devinsky J. A diary of epilepsy in the early 1800s. *Epilepsy Behav*. 2007; 10(2):304-10.
- Dinner DS. Effect of Sleep on Epilepsy. *J Clin Neurophysiol*. 2002; 19(6):504-13.

- Donat JF, Wright FS. Sleep, epilepsy, and the EEG in infancy and childhood. *J Child Neurol*. 1989; 4(2):84-94.
- Dos Santos JG Jr, Longo BM, Blanco MM, Menezes de Oliveira MG, Mello LE. Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res*. 2005 20; 1066(1-2):37-48.
- Drake ME Jr, Pakalnis A, Phillips BB, Denio LS. Sleep and sleep deprived EEG in partial and generalized epilepsy. *Acta Neurol Belg*. 1990; 90(1):11-9.
- Engel J Jr. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist*. 2001; 7(4):340-52.
- Elger CE, Wieser HG. Pathophysiology of epilepsy. *Schweiz Med Wochenschr*. 1984; 114(38):1278-88.
- Ferreira BLC, Valle AC, Cavaleiro EA, Timóteia C. Prevalence of epileptic seizures during the wakefulness-sleep cycle in rats. *Dev Neurosci*. 1999; 21(3-5):339-404.
- Ferreira BL, Valle AC, Cavaleiro EA, Timóteia C. Absence-like seizures in adult rats following pilocarpine-induced status epilepticus early in life. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36(12):1685-94.
- Foldvary-Schaefer N, Grigg-Damberger M. Sleep and epilepsy: what we know, don't know, and need to know. *J Clin Neurophysiol*. 2006; 23(1):4-20.
- Fraser AD. New drugs for the treatment of epilepsy. *Clin Biochem*. 1996; 29(2):97-110.
- French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol*. 1993; 34(6):774-80.
- Fulton JF. Neurophysiology, 1942-1948. *N Engl J Med*. 1949; 240(23):920.
- Fundação Nacional Americana de Sono. 2008 *Sleep in America Poll*. *National Sleep Foundation* [Internet]. 2008 Aug 13. [cited 2008 Aug 14]. Available from: http://www.sleepfoundation.org/site/c.huIXKjM0IxF/b.2417353/k.6764/Sleep_in_America_Polls.htm.
- Futatsugi Y, Riviello JJ Jr. Mechanisms of generalized absence epilepsy. *Brain Dev*. 1998; 20(2):75-9.

- Garzillo CL, Mello LE. Characterization of reactive astrocytes in the chronic phase of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsia*. 2002; 43 (Suppl 5):107-9.
- Gibbs, E.L.; Gibbs, F.A. Diagnostic and localizing value of eletroencephalographic studies in sleep. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 1947; 26:366-376.
- Gigli GL, Placidi F, Diomedi M, Maschio M, Silvestri G, Scalise A, Marciani MG. Nocturnal sleep and daytime somnolence in untreated patients with temporal lobe epilepsy: changes after treatment with controlled-release carbamazepine. *Epilepsia*. 1997; 38(6):696-701.
- Gloor P. Generalized epilepsy with spike-and-wave discharge: a reinterpretation of its electrographic and clinical manifestations. The 1977 William G. Lennox Lecture, American Epilepsy Society. *Epilepsia*. 1979; 20(5):571-88.
- Goffin K, Nissinen J, Van Laere K, Pitkänen A. Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. *Exp Neurol*. 2007; 205(2):501-5.
- Gomes MM. História da Epilepsia: Um Ponto de Vista Epistemiológico. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*. 2006; 12(3): 161-7
- Green JD, Arduini AA. Hippocampal electrical activity in arousal. *J Neurophysiol*. 1954; 17(6):533-57.
- Green JD. The hippocampus. *Physiol Rev*. 1964;44: 561-608.
- Guedes FA, Galvis-alonso OY, Leite JP. Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal mesial: insights a partir de estudos em humanos e em modelos animais. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*. 2006;12 (suppl.1):10-7.
- Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 1987; 147 (Pt 3): 229-263.
- Halász P. The generalized epileptic spike-wave mechanism and the sleep-wakefulness system. *Acta Physiol Acad Sci Hung*. 1972; 42(3):293-314.
- Halász P, Dévényi E. Petit mal absences in night sleep with special reference to transitional sleep and REM periods. *Acta Med Acad Sci Hung*. 1974; 31(1-2):31-45.

- Halász P. Generalized epilepsy with spike-wave paroxysms as an epileptic disorder of the function of sleep promotion. *Acta Physiol Acad Sci Hung.* 1981; 57(1):51-86.
- Herman ST, Walczak TS, Bazil CW. Distribution of partial seizures during the sleep--wake cycle: differences by seizure onset site. *Neurology.* 2001; 56(11):1453-9.
- Hofstra WA, de Weerd AW. How to assess circadian rhythm in humans: a review of literature. *Epilepsy Behav.* 2008; 13(3):438-44.
- Hogan RE, Kaiboriboon K. The "dreamy state": John Hughlings-Jackson's ideas of epilepsy and consciousness. *Am J Psychiatry.* 2003; 160(10):1740-7.
- ILAE – International League Againsts Epilepsy. *Summary of key recommendations from the Commission on Classification and Terminology – For Discussion at the ICE in Budapest.* [Internet]. 2008 May 26 [cited 2008 May 29]. Available from: <http://www.ilae.org/Visitors/Centre/ctf/CTFoverview.cfm>
- Janz D. Nocturnal or sleep epilepsy as the expression of a special course of epileptic disease. *Nervenarzt.* 1953;24(9):361-7
- Janz D. Epilepsy and the sleeping-walking cycle. In: Vinken PJ, Bruyn GW, editors. *Handbook of clinical neurology.* Amsterdam: North Holland; 1974. v.15, p.457-90.
- Jones BE. From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26(11):578-86.
- Jouvett M. The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol.* 1972;64:166-307.
- Kalia M. Neurobiology of sleep. *Metab Clin Exp.* 2006. 55(Suppl 2):S2-S6.
- Kandel A, Bragin A, Carpi D, Buzsáki G. Lack of hippocampal involvement in a rat model of petit mal epilepsy. *Epilepsia.* 1996; 23(2):123-27.
- Kandel A, Buzsáki G. Cellular-synaptic generation of sleep spindles , spike-and-wave discharges, and evoked thalamocortical responses in the neocortex of the rat. *J Neurosci.* 1997; 17(17):6783-97.

- Kellaway P, Frost JD Jr, Crawley JW Time modulation of spike-and-wave activity in generalized epilepsy. *Ann Neurol*. 1980;8(5):491-500.
- Kleitman, N. Sleep and Wakefulness. Chicago: The University of Chicago Press; 1963.
- Kostopoulos G, Gloor P, Pellegrini A, Siatitsas I. A study of the transition from spindles to spike and wave discharge in feline generalized penicillin epilepsy: EEG features. *Exp Neurol*. 1981; 73(1):43-54.
- Kostopoulos GK. Spike-and-wave discharges of absence seizures as a transformation of sleep spindles: the continuing development of a hypothesis. *Clinical Neurophysiology*. 2000; 111(2):S27-S38.
- Kotagal P, Yardi N. The relationship between sleep and epilepsy. *Semin Pediatr Neurol*. 2008; 15(2):42-9.
- Krieg, WJS. Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. A topography of the cortical areas. *J Comp Neurol*. 1946; 84(2):221-275.
- Krout KE, Kawano J, Mettenleiter TC, Loewy AD. CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience*. 2002; 110(1):73-92.
- Langdon-Down M, Brain WR. Time of day in relation to convulsions in epilepsy. *Lancet* 1929; 213(5577): 1029-32.
- Larson-Prior LJ, Zempel JM, Nolan TS, Prior FW, Snyder AZ, Raichle ME. Cortical network functional connectivity in the descent to sleep. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(11):4489-94
- Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*. 1990a; 14(4):511-7.
- Leite JP, Nakamura EM, Lemos T, Masur J, Cavalheiro EA. Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. *Braz J Med Biol Res*. 1990b;23(8):681-3
- Lemos T, Cavalheiro EA. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp Brain Res*. 1995;102(3):423-8
- Longo BM, Sanabria ER, Gabriel S, Mello LE. Electrophysiologic abnormalities of the hippocampus in the pilocarpine/cycloheximide model of chronic spontaneous seizures. *Epilepsia*. 2002;43 (Suppl 5):203-8.

- Longo BM, Mello LE. Effect of long-term spontaneous recurrent seizures or reinduction of status epilepticus on the development of supragranular mossy fiber sprouting. *Epilepsy Res.* 1999; 36(2-3):233-41.
- Longrigg J. Epilepsy in ancient Greek medicine: the vital step. *Seizure.* 2000; 9(1):12-21.
- Loomis AL, Harvey EN, Hobart G. Potential rhythms of the cerebral cortex during sleep. *Science.* 1935a; 81(2111):597-598.
- Loomis AL, Harvey EN, Hobart G. Further observations on the potential rhythms of the cerebral cortex during sleep. *Science.* 1935b; 82(2122):198-200.
- Loomis AL, Harvey EN, Hobart G. Brain potentials during hypnosis. *Science.* 1936;83(2149):239-41
- Lugaresi E, Cirignotta F, Coccagna G, Montagna P. Nocturnal myoclonus and restless legs syndrome. *Adv Neurol.* 1986; 43:295-307.
- MacCormick DA. Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Progress in Neurobiology.* 1992; 39(4):337-388.
- MacDonald RL, Meldrum BS. General principles: principles of antiepileptic drug action . In: Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS (editors). *Antiepileptic Drugs.* 4^a ed. New York: Raven Press; 1995. p.61-77.
- Maloney KJ, Mainville L, Jones BE. c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci.* 2000; 20(12):4669-79.
- Malow BA, Varma NK. Seizures and arousals from sleep--which comes first? *Sleep.* 1995; 18(9):783-6.
- Malow BA, Bowes RJ, Lin X. Predictors of sleepiness in epilepsy patients. *Sleep.* 1997; 20(12):1105-10.
- Malow BA, Levy K, Maturen K, Bowes R. Obstructive sleep apnea is common in medically refractory epilepsy patients. *Neurology* 2000; 55:1002-7.

- Malow BA. Sleep and epilepsy. *Neurol Clin.* 2005;23(4):1127-47.
- Malow BA. The interaction between sleep and epilepsy. *Epilepsia.* 2007; 48 (Suppl 9):36-8.
- Manni R, Galimberti CA, Zucca C, Parietti L, Tartara A. Sleep patterns in patients with late onset partial epilepsy receiving chronic carbamazepine (CBZ) therapy. *Epilepsy Res* 1990; 7(1):72-6.
- Manni R, Tartara A. Evaluation of sleepiness in epilepsy. *Clin Neurophysiol.* 2000; 111 (suppl 2):111-4
- Masia SL, Devinsky O. Epilepsy and Behavior: A Brief History. *Epilepsy Behav.* 2000;1(1):27-36.
- Mathern GW, Babb TL, Mischel PS, Vinters HV, Pretorius JK, Leite JP, Peacock WJ. Childhood generalized and mesial temporal epilepsies demonstrate different amounts and patterns of hippocampal neuron loss and mossy fiber synaptic reorganization. *Brain.* 1996; 119 (Pt 3):965-87.
- Matos G, Vicente E.M, Rossetti V, Botte S, Santos AMA, Sameshima K, Baldo MVC, Valle AC. *Avaliação dos efeitos da privação de sono paradoxal sobre os processos epileptogênicos para indução de crises límbicas no modelo da pilocarpina.* (Present at XI Congresso Brasileiro de Sono; 2007; Fortaleza, Brasil).
- Matos G, Vicente EM, Santos AMA, Sameshima K, Baldo MVC, Valle AC. *Análise dos processos epileptogênicos em ratos submetidos a privação do sono paradoxal Modelo da Pilocarpina.* (Present at I Congresso IBRO/LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica; 2008; Buzios, Brasil).
- Matos G, Vicente JY, Hilario FK, Sameshima K, Timo-laria C, Valle AC. *Eventos tônicos e fásicos no sono dessincronizado no modelo experimental da epilepsia do lobo temporal.* (Presented at XX FESBE; 2005; Águas de Lindóia, Brasil. Abstracts).
- Matos G, Vicente JY, Sameshima K, Valle AC. *Identificação de padrões oníricos em ratos com epilepsia do lobo temporal.* (Presented at XXI FESBE; 2006; Águas de Lindóia, Brasil. Abstracts).
- Meldrum B. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res.* 1991;10(1):55-61.
- Meldrum BS. Update on the mechanism of action of anticonvulsant drugs. *Epilepsia.* 1996; 37(Suppl 6): 4-11.

- Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*. 1993; 34(6):985-95.
- Méndez M, Radtke RA. Interactions between sleep and epilepsy. *J Clin Neurophysiol*. 2001; 18(2):106-27.
- Miller JW. The role of mesencephalic and thalamic arousal systems in experimental seizures. *Prog Neurobiol*. 1992; 39(2):155-78.
- Monteiro, MA. Estudo da Pressão Arterial e da Frequência Cardíaca em Modelos Experimentais de Epilepsia Generalizada do Tipo Ausência e Epilepsia do Lobo Temporal [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.
- Montplaisir J, Laverdière M, Saint-Hilaire JM, Walsh J, Bouvier G. Sleep and temporal lobe epilepsy: a case study with depth electrodes. *Neurology*. 1981; 31(10):1352-6.
- Montplaisir J, Laverdière M, Saint-Hilaire JM. Sleep and epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*. 1985; 37:215-39
- Moruzzi G. The sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol*. 1972; 64:1-165.
- Neckelmann D, Amzica F, Steriade M. Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. III. Synchronizing mechanisms. *J Neurophysiol*. 1998; 80(3):1480-94.
- Negrão N. *Ciclos de sono, fusos de sono natural e anestésico e potenciais de recrutamento no rato* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1967.
- Niedermeyer E. Complexities of primary generalized epilepsy. *Clin Electroencephalogr*. 1981; 12(4):177-91
- Nielsen KA, Dahl M, Tømmerup E, Hansen BR, Erdal J, Wolf P. Diurnal lamotrigine plasma level fluctuations: clinical significance and indication of shorter half-life with chronic administration. *Epilepsy Behav*. 2008; 13(3):470-3.
- Nunes PV, Valle AC, Timo-laria C. Epileptogenic potentials recorded from the cerebellar cortex in rats. *Epilepsia*. 1999; 40:132. (Present at 23th International Epilepsy Congress; 1999; Prague, Czech Republic).
- Ohdo S, Watanabe H, Ogawa N, Yoshiyama Y, Sugiyama T. Circadian rhythm of embryotoxicity induced by sodium valproate in mice. *Eur J Pharmacol*. 1995; 293(3):281-5

- Patry FL. The relation of time of day, sleep and other factors to the incidence of epileptic seizures. *Am J Psychiatry*. 1931; 10:189-813.
- Patry G, Lyagoubi S, Tassinari CA. Subclinical "electrical status epilepticus" induced by sleep in children. A clinical and electroencephalographic study of six cases. *Arch Neurol*. 1971; 24(3):242-52.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press, 1997.
- Penfield W, Boldrev E. Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain*. 1937; 60:389-443.
- Peredery O, Persinger MA, Parker G, Mastrosov L. Temporal changes in neuronal dropout following inductions of lithium/pilocarpine seizures in the rat. *Brain Res*. 2000; 881(1):9-17.
- Placidi F, Scalise A, Marciani MG, Romigi A, Diomedi M, Gigli GL. Effect of antiepileptic drugs on sleep. *Clin Neurophysiol*. 2000;111 (Suppl 2):115-9.
- Priel MR, dos Santos NF, Cavaleiro EA. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res*. 1996; 26(1):115-21.
- Quigg M, Straume M, Menaker M, Bertram EH 3rd. Temporal distribution of partial seizures: comparison of an animal model with human partial epilepsy. *Ann Neurol*. 1998; 43(6):748-55.
- Quigg M, Clayburn H, Straume M, Menaker M, Bertram EH 3rd. Hypothalamic neuronal loss and altered circadian rhythm of temperature in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 1999; 40(12):1688-96.
- Quigg M, Clayburn H, Straume M, Menaker M, Bertram EH 3rd. Effects of circadian regulation and rest-activity state on spontaneous seizures in a rat model of limbic epilepsy. *Epilepsia*. 2000a;41(5):502-9.
- Quigg M. Circadian rhythms: interactions with seizures and epilepsy. *Epilepsy Res*. 2000b; 42(1):43-55
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972a; 32(3):269-79.

- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972b; 32(3):281-94.
- Raol YH, Meti BL. Sleep-wakefulness alterations in amygdala-kindled rats. *Epilepsia.* 1998; 39(11):1133-7.
- Ricardo JA, Negrão N, Pereira JSC. ECoG effects of peripheral deafferentation of prepyriform and visual cortices in rats. *Physiol. Behav.* 1980; 24:727-36.
- Riemann D, Spiegelhalder K, Feige B, Voderholzer U, Berger M, Perlis M, Nissen C. The hyperarousal model of insomnia: A review of the concept and its evidence. *Sleep Med Rev.* In press 2009.
- Sameshima K, Baccalá LA. Using partial directed coherence to describe neuronal ensemble interactions. *J Neurosci Methods.* 1999; 94(1):93-103.
- Sammaritano M, Sherwin A. Effect of anticonvulsants on sleep. *Neurology.* 2000; 54(5 Suppl 1):16-24.
- Sanabria ERG, Scorza AS, Bortolotto ZA, Calderazzo-Filho LS, Cavalheiro EA. Disruption of light-induced c-Fos immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei of chronic epileptic rats. *Neurosci Lett.* 1996; 216 (2):105-8.
- Sanabria ERG, da Silva AV, Spreafico R, Cavalheiro EA. Damage, reorganization, and abnormal neocortical hiperexcitability in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2002; 43(Suppl. 5):96-106.
- Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol.* 2003; 16(2):165-70.
- Santos LM dos, Dzirasa K, Kubo R, Silva MTA, Ribeiro S ; Sameshima K, Valle AC, Timo-laria C. Baseline hippocampal theta oscillation speeds correlate with rate of operant task acquisition. *Behavioral Brain Research,* 2008; 190(1):152-5.
- Sato S, Dreifuss FE, Penry JK. The effect of sleep on spike-wave discharges in absence seizures. *Neurology.* 1973;23(12):1335-45.
- Sengoku A. The contribution of J. H. Jackson to present-day epileptology. *Epilepsia.* 2002; 43 (Suppl 9):6-8.
- Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience.* 2005;130(4):813-31. Shimitz e Hof, 2005).

- Scorza FA, Arida RM, Cysneiros RM, Scorza CA, de Albuquerque M, Cavaleiro EA Qualitative study of hippocampal formation in hypertensive rats with epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005; 63(2A):283-8.
- Shouse MN, da Silva AM, Sammaritano M. Circadian rhythm, sleep, and epilepsy. *J Clin Neurophysiol.* 1996; 13(1):32-50.
- Shouse MN, Farber PR, Staba RJ. Physiological basis: how NREM sleep components can promote and REM sleep components can suppress seizure discharge propagation. *Clin Neurophysiol* 2000; 111 (Suppl 2):9-18.
- Simões CA. , Valle AC, Timo-laria C. Correlation between concomitant theta waves in nucleus reticularis pontis oralis and in hippocampus, thalamus and neocortex during dreaming in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29(12):1645-50.
- Sloviter RS. Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus.* 1991; 1(1):41-66.
- Sloviter RS. Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neurosci Lett.* 1992; 137(1):91-6.
- Sloviter RS. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *C R Biol.* 2005;328(2):143-53.
- Shneker BF, Fountain NB Epilepsy. *Dis Mon.* 2003; 49(7):426-78.
- Stables JP, Bertram E, Dudek FE, Holmes G, Mathern G, Pitkanen A, White HS. Therapy discovery for pharmacoresistant epilepsy and for disease-modifying therapeutics: summary of the NIH/NINDS/AES models II workshop. *Epilepsia.* 2003;44(12):1472-8
- Stafstrom CE. Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006; 26(8):983-1004
- Steriade M Cholinergic control of thalamic function. *Arch Int Physiol Biochim.* 1990;98(3):11-46
- Steriade M, Contreras D Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. I. Role of neocortex and thalamus. *J Neurophysiol.* 1998 Sep;80(3):1439-55.

- Steriade, M., Amzica, F., Neckelmann, D., Timofeev, I. Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. II. Extra- and intracellular patterns. *J Neurophysiol.* 1998; 80(3):1456–79.
- Steriade M, Timofeev I. Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. *Neuron.* 2003; 37(4):563-76
- Stewart LS, Leung LS. Temporal lobe seizures alter the amplitude and timing of rat behavioral rhythms. *Epilepsy Behav.* 2003 Apr;4(2):153-60.
- Stores G, Wiggs L, Campling G. Sleep disorders and their relationship to psychological disturbance in children with epilepsy. *Child Care Health Dev.* 1998; 24(1):5-19.
- Sutula T, He XX, Cavazos J, Scott G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science.* 1988; 239 (4844): 1147-50.
- Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol.* 1989;26(3):321-30
- Tauck DL, Nadler JV Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci.* 1985; 5(4):1016-22.
- Thorpy MJ. Which clinical conditions are responsible for impaired alertness? *Sleep Med.* 2005;6 (Suppl 1):13-20
- Timofeev I, Grenier F, Steriade M Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. IV. Paroxysmal fast runs in cortical and thalamic neurons. *J Neurophysiol.* 1998; 80(3):1495-513.
- Timo-laria C, Negrão N, Schmidek WR, Hoshino K, Lobato de Menezes CE, Leme da Rocha T. Phases and states of sleep in the rat. *Physiol Behav.* 1970; 5(9):1057-62.
- Timo-laria C. Histórico e filogênese do sono. In: Tufik S., editor. *Sono. Aspectos Básicos.* São Paulo, Universidade Federal de São Paulo: Instituto do Sono; 2000. p. I1-I27.
- Timo-laria C. Evolução histórica do estudo do sono. In: Tufik S (editor). *Medicina e biologia do sono.* São Paulo: Manole; 2008. p.1-6.
- Torii S, Wikler A. Effects of atropine on electrical activity of hippocampus and cerebral cortex in cat. *Psychopharmacologia.*

1966;9(3):189

- Touchon J, Baldy-Moulinier M, Billiard M, Besset A, Cadilhac J. Sleep organization and epilepsy. *Epilepsy Res Suppl.* 1991;2:73-81.
- Triarhou LC. The percipient observations of Constantin von Economo on encephalitis lethargica and sleep disruption and their lasting impact on contemporary sleep research. *Brain Res Bull.* 2006; 69(3):244–58.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983;9(3):315
- Turski L, Cavalheiro EA, Czuczwar SJ, Turski WA, Kleinrok Z. The seizures induced by pilocarpine: behavioral, electroencephalographic and neuropathological studies in rodents. *Pol J Pharmacol Pharm.* 1987; 39(5):545-55.
- Ure JA, Perassolo M. Update on the pathophysiology of the epilepsies. *J Neurol Sci.* 2000; 177(1):1-17.
- Ursin R. The two stages of slow wave sleep in the cat and their relation to REM sleep. *Brain Res.* 1968; 11(2):347-56.
- Ursin R. Sleep in the cat: a parallel increase of deep slow wave sleep and REM sleep following total sleep deprivation. *Acta Physiol Scand.* 1971; 82(3):1A.
- Ursin R. Differential effect of para-chlorophenylalanine on the two slow wave sleep stages in the cat. *Acta Physiol Scand.* 1972; 86(2):278-85.
- Valle AC, Pellarin L, Timo-laria C. *Desynchronization and theta waves during oniric activity in the rat.* (Presented at 14th Congress of the European Sleep Research Society; 1998; Madrid, Spain, Abstracts).
- Valle AC, Sameshima K, Timo-laria C. *Oniric patterns in the rat: a study of the theta waves frequency.* (Present at Congresso Anual da FESBE/ Sociedade Brasileira de Fisiologia; 1995; Serra Negra, Brasil. Abstracts).
- Valle AC, Timo-laria C, Fraga JL, Sameshima K, Yamashita R. Theta waves and behavioral manifestations of alertness and dreaming activity in the rat. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25(7):745-50.
- Valle AC. *Análise eletrofisiológica do hipocampo durante o sono dessincronizado* [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1995.

- van Luijtelaar ELJM, Coenen AML. An EEG averaging technique for automated sleep-wake stage identification in the rat. *Physiol Behav.* 1983; 33(5):837-41
- Vicente JY, Matos G, Sameshima K, Valle AC. *Perfil eletrofisiológico do hipocampo dorsal de ratos tratados com pilocarpina.* (Presented at XXI FESBE; 2006; Águas de Lindóia, Brasil. Abstracts).
- Viteri C. Epilepsy and sleep. *An Sist Sanit Navar.* 2007; 30 (Suppl 1):107-12.
- Yang JD, Elphick M, Sharpley AL, Cowen PJ. Effects of carbamazepine on sleep in healthy volunteers. *Biol Psychiatry* 1989; 26(3):324-28.
- Wetzel W, Wagner T, Balschun D. REM sleep enhancement induced by different procedures improves memory retention in rats. *Eur J Neurosci.* 2003; 18(9):2611-7.
- Wieser HG; ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia.* 2004; 45(6):695-714.
- Zilles K. Anatomy of the neocortex, cytoarchitecture and myeloarchitecture. In: Kolb B, Tess RC (editors). *The Cerebral Cortex of the Rat.* Cambridge: The MIT Press; 1991. p. 77-120.