UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ÍTALO ROSAL LUSTOSA

AVALIAÇÃO DO MODELO DE *STATUS EPILEPTICUS* POR OUABAÍNA: DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULR À ANÁLISE DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E INDICADORES DE DANO CEREBRAL

FORTALEZA

2016

ÍTALO ROSAL LUSTOSA

AVALIAÇÃO DO MODELO DE *STATUS EPILEPTICUS* POR OUABAÍNA: DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULR À ANÁLISE DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E INDICADORES DE DANO CEREBRAL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. David Freitas de Lucena

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L99a Lustosa, Ítalo Rosal.
AVALIAÇÃO DO MODELO DE STATUS EPILEPTICUS POR OUABAÍNA : DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULR À ANÁLISE DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E INDICADORES DE DANO CEREBRAL / Ítalo Rosal Lustosa. – 2016.
118 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. David Freitas de Lucena.

1. Epilepsia. 2. Status epilepticus. 3. Modelos experimentais. 4. Na+,K+-ATPase. I. Título.
CDD 615.1

ÍTALO ROSAL LUSTOSA

AVALIAÇÃO DO MODELO DE *STATUS EPILEPTICUS* POR OUABAÍNA: DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULR À ANÁLISE DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E INDICADORES DE DANO CEREBRAL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. David Freitas de Lucena

Aprovada em ____/____/_____

BANCA EXAMINADORA:

_____

Prof. Dr. David Freitas de Lucena (Orientador)
Universidsde Federal do Ceará – UFC

_____

Profª Drª Marta Maria de França Fonteles
Universidsde Federal do Ceará – UFC

_____

Prof. Dr. José Christian Machado Ximenes
Centro Universitário Unichristus

A meus pais, Salmeron *(in memoriam)* e Iracilda (“Cidinha”) por me proporcionarem uma família minimamante estruturada e, na medida do possível, o fomento necessário ao progresso intelectual e acadêmico dos filhos.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**. Só ele sabe do mal extrair o bem. Ele é a confiança que não decepciona.

A meus **orientadores**, Profª. Drª. **Silvânia Maria Mendes Vasconcelos** e Prof. Dr. **David Freitas de Lucena** (presidente da banca avaliadora) por terem me recebido. Muito obrigado. Escusem as incongruências!

Aos integrantes da banca, Prof. Dr. **José Christian Ximenes** e Profª Drª **Marta Maria Fonteles**.

A minha **Mãe**, **Iracilda Ribeiro Rosal**. Ela lançou mão de sutis diligências para me demover do mestrado. Em vão. Dando-se enfim por vencida, foi ela nada menos que meu meu CNPq, minha CAPES, minha FUNCAP, financiando quase inteiramente esta insensata e economicamente desastrosa aventura de brincar de cientista. Isto, além da presença constante e do apoio incondicional. Desculpa, Mãe! E muito obrigado por tudo, por sempre.

A meu **Pai**, **Salmeron Gomes Lustosa** (*in memoriam*). Em seus últimos dias sobre a terra tentou me demover da intenção de fazer mestrado, aconselhando-me a residência. Em vão. Ainda me flagro por vezes tentando convencer a mim mesmo de que talvez ele estivesse errado.

Aos **professores** da pós-graduação, em particular da Neurofarmacologia, Drªs **Glauce Viana**, **Danielle Macêdo**, **Cléa Florenço** e **Marta Maria Fonteles**. Elas fornecem sugestões, admoestações, referências abalizadoras e, em certos casos, o inestimável voto de confiança e reconhecimento pelo esforço. Ao Prof. Dr. **Vagnaldo Fechine** pela revisão do tratamento estatístico.

Aos **colegas** de pós-graduação e de laboratório **Pedro Everson**, **Michelle Albuquerque, Camila Naiane**, **Talita Matias**, **Kátia Cilene**, **Germana Vasconcelos**, **Rafael Reis**, **Eduardo Ribeiro**, **Tatiane Queiroz**, **Charliene Xavier**, **Lucas Borges** e **Manuel Alves**. Sua convivência aplaca o desgaste na jornada. Seus comentários e sugestões são essenciais para o *aggiornamento*. Agradeço de maneira toda especial à **Roberta Costa**, que permitiu que eu a acompanhasse e me deu solícitas preleções de estereotaxia no início do curso. Ela sabe como fui "grudento" (risos). Também à **Isabelle Gois**, à **Greyce Coelho** e à **Sarah Escudeiro**, as garotas da estereotaxia. Seus macetes e experiências a mim transferidos viabilizaram o presente trabalho. À **Kátia Gomes (Molécula)** pelas dicas essenciais com a resina acrílica e as brocas odontológicas.

A **Thiago Guedes Holanda** e **Regilane Santos**. Amigos sinceros, para além de alunos de iniciação valorosos. Espero tê-los em breve por colegas de pós-graduação e que esta

cooperação ora instalada seja duradoura e frutuosa. Desejo-lhes os maiores êxitos em suas empreitas.

Ao **pessoal técnico e funcionários**, especialmente à **Maria Vilani (Vila)**, pelo apoio prestimoso, por viabilizarem o desenvolvoimento desta dissertação e ainda por diversos momentos jocosos.

Ao Pe. **Pedro B. Maione, S.J.** e ao Mons. Pe. **Amadeu Matias Filho**, **diretor e confessor meus**. Por me servirem o alimento e a bebida salvíficos de que jamais quero prescindir, essenciais para seguir caminhando. Por me evidenciarem os princípios que me compeliram a tomar esta via, i.e.: 1) retribuir a Cristo, presentre que está Ele na figura do irmão, através da edificação deste por meio do saber; 2) melhor servir ao irmão no ofício hipocrático; ambos princípios jaziam insuspeitados em mim e formam uma só coisa com senso do dever de consiciência cuja recapitulação é o melhor lenitivo nos momentos de tibieza.

A todos, enfim, que contribuíram em maior ou menor grau para que esta dissertação fosse feita.

“The best model of a cat is another one; the same cat if possible.” (Arturo Rosenblueth Stearns, 1900-1970)

RESUMO

O *status epilepticus* (*SE*) é uma forma comum de emergência clínica potencialmente letal. O avanço na terapia antiepiléptica nas últimas décadas não modificou as taxas de responsividade a tratamento desta condição, bem como das epilepsias em geral. A regulação para baixo da tividade de Na^+,K^+-ATPase (NKA) tem sido implicada na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas, inclusive epilepsias. No presente trabalho, foram induzidas crises epilépticas por ouabaína via intracerebroventricular (*i.c.v.*), um modelo com valor preditivo para crises tônico-clônias generalizadas. Foram delineadas as características etológicas do *SE* com vistas à semiologia de valor localizatório e mediram-se indicadores neuroquímicos: lipoperoxidação, TBARS; concentração de glutationa, GSH; nitrito, NO_2^- nas áreas cerebrais córtex pré-frontal (F), hipocampo (H), corpo estriado (E), tálamo (T) e mesencéfalo (M). Cerca de ~85% dos animais que recebem 29,23 µg de ouabaína via *i.c.v.* exibiram um comportamento consistente de duas crises procursivas intercaladas por *freezing* seguidas de clono parcial que evolui com clono generalizado e perda do reflexo de endireitamento com fenômenos tônicos tardios. Este padrão é altamente sugestivo de ictogênese primária multifocal em áreas límbica (H) e de tronco encefálico (colículo inferior) seguidas de generalização. A lipoperoxidação esteve significativamente aumentada em relação ao controle em todas as áreas estudadas: F, E e H (p<0,0001); T (p<0,001); M (p<0,01). A [GSH] esteve significativamente reduzida apenas em F (p<0,01) e E (p<0,0001). A [NO_2^-] esteve aumentada em T e M (p<0,01). Valores de p<0,05 foram considerados significativos. A neuroquímica evidencia grave dano oxidativo, nomeadamente nas membranas lipídicas. O aumento da [NO_2^-] em estruturas caudais corrobora com a literatura sobre o modelo audiogênico. Fornece-se ainda uma hipótese sobre a fisiopatologia do modelo da ouabaína *i.c.v.* que pode agregar-lhe relevância patomecanística enquanto construto teórico. Ademais, aportam-se amplas possibilidades para a pesquisa e desenvolvimentos de medicamentos através da implantação do protocolo de via de administração *i.c.v.* crônica.

Palavras-chave: Epilepsia. *Status epilepticus*. Modelos experimentais. Na^+,K^+-ATPase.

Evaluating the Ouabain-induced model of *Status epilepticus*: From intracerebroventricular route to analysis of behavioral and brain damage parameters

ABSTRACT

Status epilepticus (SE) is a common and potentially lethal form of clinical emergency. The advances in antiepileptic therapy in the last decades failed to change the rates of treatment responsiveness in that condition, as well as in epilepsies. Down regulation of Na +, K + -ATPase (NKA) activity has been implicated in the pathophysiology of various neurodegenerative diseases, including epilepsy. In the present study, epileptic seizures were induced through intracerebroventricular (i.c.v.) ouabain, a model with predictive value for generalized tonic-clonic seizures. The ethological characteristics of the seizures were outlined regarding the localizing semiology. Neurochemical analysis were also performed: lipoperoxidation, TBARS; reduced glutathione (GSH) concentration; and nitrite (NO_2^-) concentration in prefrontal cortex (F), hippocampus (H), striatum (E), thalamus (T) and mesencephalon (M). About ~ 85% of the animals receiving 29.23 μg of *i.c.v.* ouabain exhibited a behavior consisting of two procursive seizures intercalated by freezing and followed by partial clonus evolving as generalized clonus with loss of the righting reflex and late tonus. This pattern is highly suggestive of primary multifocal ictogenesis in limbic (H) and brainstem (lower colliculus) areas followed by secondary generalization. Lipoperoxidation was significantly increased in relation to control in all studied areas: F, E and H ($p < 0.0001$); T ($p < 0.001$); M ($p < 0.01$). GSH concentration was significantly reduced only in F ($p < 0.01$) and E ($p < 0.0001$). NO_2^- concentration was increased in T and M ($p < 0.01$); Values of $p < 0.05$ were considered significant. Neurochemistry evidences severe oxidative damage, mainly in lipid membranes. The increase in NO_2^- in caudal structures corroborates with literature about the audiogenic model. A hypothesis that may aggregate pathomechanistic relevance to the model as theoretical construct is thrown. Furthermore, the implementation of an *i.c.v* administration protocol offers ample possibilities for the research and drug development.

Keywords: Epilepsy. *Status epilepticus*. Experimental models. Na^+,K^+-ATPase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sinopse dos modelos *in vivo* de crises epilépticas e epilepsias …….52

Figura 2 - Modelos *in vivo* de crises epilépticas e epilepsias conforme as síndromes clínicas que recapitulam ……..……53

Figura 3 - Árvore de decisão para testagem de atividade antiepiléptica aplicada no projeto de desenvolvimento de antiepilépticos do National Institutes of Health – EUA …..……..…56

Figura 4 - Representação esquemática do ciclo reacional da Na^+,K^+-ATPase ……64

Figura 5 - Estrutura química da ouabaína …….65

Figura 6 - Estrutura química básica dos cardenolídeos e dos bufadienolídeos …….65

Figura 7 - Etograma do *status epilepticus* convulsivo por ouabaína *i.c.v.* ……92

Figura 8 - Níveis de lipoperoxidação em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo dos grupos ACSF e ACSF + O ……..…….……93

Figura 9 - Concentração de glutationa em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo dos grupos ACSF e ACSF + O……...…….94

Figura 10 - Concentração de nitrito em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo dos grupos ACSF e ACSF + O …….……..95

Figura 11 – Corte coronal de cérebro de rato a fresco 0,9 mm caudal ao Bregma mostrando o tracto da cânula para ventrículo lateral.....96

Figura 12 - Lâmina histológica de corte coronal de cérebro de rato 0,9 mm caudal ao Bregma corado por HE mostrando o tracto da cânula para o ventrículo lateral.....97

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Dimensões temporais da Classificação Operacional de *status epilepticus*……..…..28
Quadro 1 - Eixos para classificação do *status epilepticus* ……..29
Tabela 2 - Eixo 1: Semiologia do *status epilepticus* ……....31
Tabela 3 - Eixo 2: Etiologia dos *status epilepticus* ……...…32
Quadro 2 - Condições atualmente indeterminadas (ou "síndromes limítrofes") …….....32
Tabela 4 - Eixo 2: Lista das etiologias conhecidas de *status epilepticus* …….....…….…33
Tabela 5 - Eixo 3: Correlatos eletroencefalográficos ……...37
Tabela 6 - Eixo 4: Faixa etária ……..…37
Tabela 7 - Eixo 4: Faixa etária. Exemplos de síndromes eletroclínicas distribuídos por idade..37
Quadro 3 - Definição operacional (prática) de epilepsia ……..43
Quadro 4 - Representação sumária da Classificação Operacional de Crises Epilépticas proposta pela International League Against Epilepsy……..48
Quadro 5 - Papeis dos modelos animais no desenvolvimento de fármacos antiepilépticos (FAE)……50
Tabela 8 - Materiais para manufatura dos implantes craniais ……..…….80
Tabela 9 - Fármacos usados na cirurgia estereotáxica……..…….81
Tabela 10 - Material cirúrgico específico da cirurgia estereotáxica……..…82
Tabela 11 - Fármacos injetados via intracerebroventricular ……84
Tabela 12 - Composição química do fluido cerebrospinal artificial (ACSF) ……84
Tabela 13 – Estadiamento de crise convulsiva generalizada com origem em tronco encefálico (escala de Jobe) ……..…….....88
Tabela 14 - Estadiamento de crise convulsiva generalizada com origem límbica (escala de Racine modificada por Pinel e Rovner)……..…88
Tabela 15 - Incidências e tempos de latência e de duração dos comportamentos motores no *status epilepticus* convulsivo por ouabaína *i.c.v.* ……..…91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$[K^+]_e$: concentração de potássio extracelular

$[K^+]_i$: concentração de potássio intracelular

$[Na^+]_e$: concentração de sódio extracelular

$[Na^+]_i$: concentração de sódio intracelular

µg: micrograma

µL: microlitro

^3H: trítio, um dos isótopos radiativos do hidrogênio

A: domínio atuador da NKA

ACh: acetilcolina

ACSF: *artificial cerebrospinal fluid*, i.e. fluido cerebrospinal artificial

ADP: difosfato de adenosina

AINE: antiinflamatório não esteroidal

AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolpropionato

AMPAR: receptor (ionotrópico) de glutamato que sofre agonismo por alfa-amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolpropionato

anti-LGI1: anticorpos anti-proteína 1 rica em leucina inativada em glioma

AP: 1) eixo ou coordenada anteroposterior

Arg: arginina

Asp: 1) ácido aspártico; 2) aspartato

ATP: trifosfato e adenosina

ATPase: adenosina-trifosfatase, enzima capaze de hidrolisar o trifosfato de adenosina

AVC: acidente vascular cerebral

AVEI: acidente vascular cerebral isquêmico

BDNF: *brain-derived neurotrophic factor*, i.e. fator neurotrófico derivado do cérebro

BECTS: *benign epilepsy with centro-temporal spikes* epilepsia benigna com espículas centro-temporais

BOLD: *blood oxygenation level-dependent definition*, i.e. definição dependente de nível de oxigenação sanguínea, uma técnica de ressonância magnética funcional

c.: *circa*, i.e. cerca de

Ca^{+2}: cátion cálcio

CADASIL: *cerebral autosomal dominant arteriopathy with cortical infarcts and leukoencephalopathy* Arteriopatia autossômica dominante com infartos corticais e leucoencefalopatia

CEPA: comitê de ética em pesquisa Animal

Cl^-: ânion cloreto

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPF: cortex pré-flontal

CREST: *calcinosis, Raynaud phenomenon, oesophageal dysmotility, sclerodactyly, telangiectasia*

CS: cauda de Straub

CTG: clônica-tônica generalizada

$CTG_{máx}$: clônica-tônica generalizada máxima

DA: doença de Alzheimer

DBCA: Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos

DBS: *deep brain stimulation*, i.e. estimulação cerebral profunda

DE: dose efetiva

DE_{50}: dose efetiva em 50% dos animais testados

DE_{97}: dose efetiva em 97% dos animais testados

DNET: *dysembryoplastic neuroepithelial tumour*, i.e. tumor neuroepitelial disembrioplásico

DPO: dia(s) pós operatório(s)

DV: eixo ou coordenada dorsoventral

E: corpo estriado, i.e. caudado-putâmen

EAAT: *excitatory amino acid transporter*, i.e. simportador de aminoácidos excitatórios dependente de sódio

ECM: eletrochoque máximo

$EC_{mín}$: eletrochoque mínimo

ECT: Esteróide cardiotônico, classe de compostos esteroidais ligantes da NKA

EEG: eletroencefalograma

ELT: epilepsia do lobo temporal

EMJ: epilepsia mioclônica juvenil

EPC: *epilepsia partialis continua* (de Kojevnikov)

EPM: erro padrão da média

F^-: ânion fluoreto

FAE: fármaco antiepiléptico

FCD: *focal cortical dysplasia*, i.e. displasia cortical focal

f.e.m: força eletromotriz

FG: *fast gyration*, i.e. broca odontológica de alta velocidade

fMRI: *functional magnetic resonance image*, i.e. imagem por ressonância magnética funcional

FSP: *flat skull position*

FXYD: terceira subunidade (gama, γ) da adenosina-trifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio (Na^+,K^+-ATPase, NKA), uma chaperona

GABA: *gamma-aminobutyric acid*, i.e. ácido gama-aminobutírico

$GABA_A$: Receptor (ionotrópico) do ácido gama-aminobutírico acoplado a canal de ânions

GEPR: *genetic epilepsy prone rat*, cepa de *Rattus norvegicus* selecionada artificialmente para o fenótipo de susceptibilidade generalizada a estímulos ictogênicos, susceptível a crises epilépticas de múltiplos tipos, incluindo crises espontâneas, reflexas audiogênicas e de ausência.

GLAST: *glutamate-aspartate transporter*, i.e. simportador de glutamato-aspartato dependente de sódio

Gln: glutamina

GLT-1: *glutamate transporter 1*, i.e. simportador de glutamato de alta afinidade dependente de sódio

Glu: 1) ácido glutâmico; 2) glutamato

Gly: glicina

GSH: glutationa (reduzida)

H^+: próton, cátion hidrogênio

HCO_3^-: ânion hidrogenocarbonato, bicarbonato

HIV: *human immunodeficience virus*, i.e. vírus da imunodeficiência humana adquirida

Hz: Hertz, i.e. ciclos/segundo

i.c.v.: via de admimistração intracerebroventricular

i.p.: via de administração intraperitonial

IBE: *International Bureau of Epilepsy*

IC: intervalo de confiança

ILAE: *International League Against Epilepsy*, i.e. Liga Internacional Contra a Epilepsia

IP_3: inositol-1,4,5-trifosfato; trifosfato de inositol

JS: *jumping seizure*, i.e. crise convulsiva tipo salto, uma forma de crise epiléptica convulsiva procursiva

K^+: cátion potássio

KA: *kainic acid* i.e. 1) ácido caínico; 2) receptor (ionotrópico) de glutamato que sofre agonismo por ácido caínico

KM: Krushinsky-Molodkina, uma cepa de *Rattus norvegicus* selecionada artificialmente para o fenótipo susceptível a crises epilépticas reflexas audiogênicas por pesquisadores russos nos anos 1940.

Li^+: cátion lítio

Lys: lisina

M: 1) Molar, mol/L; 2) Hélice transmembrana

mA: miliAmpère

MDA: *malondialdehyde*, i.e. dialdeído malônico, produto final e marcador de lipoperoxidação, constiuinte majoritário entre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

MELAS: *mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes*, i.e. encefalopatia mitocondrial, acidose lática e episódios tipo AVC

MERF: *myoclonic encephalopathy with ragged red fibers*, i.e. encefalopatia mioclônica com fibras vermelhas "esfarrapadas"

Mg^{+2}: cátion magnésio

ML: eixo ou coordenada mediolateral

MRS: *magnetic resonance spectroscopy*, i.e. espectroscopia por ressonância magnética (de Voxel único ou múltiplo)

myk: 1) alelo *Myshkin*, com mutação constituída por troca de timina por adenina (T→A) no nucleotídeo 2.562 do gene *Atp1a3* codificante da isoforma 3 (neuronal) da subunidade α da Na^+,K^+ATPase (alelo $Atp1a3^{Myk}$), provocando substituição de isoleucina por asparagina no aminoácido 810 da estrutura primária do produto protéico (Ile^{810}→Asn, I810N) e resultando em perda de função das isoenzimas de Na^+,K^+ATPase contendo esta subunidade, sendo letal (morte fetal no 14º dia pós-fecundação) em homozigose; 2) camundongo portador desta mutação

N: 1) nitrogênio; 2) domínio ligador de nucleotídeo da NKA

Na^+,K^+ATPase: adenosina-trifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio, bomba de sódio da família das ATPases tipo P

Na^+: cátion sódio

nAChR: receptor nicotínico da acetilcolina

NARP: Neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa

NCX: *natrium-calcium exchanger*, i.e. trocador iônico sódio-cálcio

NH_4^+: cátion amônio

NIH: *National Institutes of Health*

NINDS: *National Institutes of Neurological Disorders and Stroke*

NKA: adenosina-trifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio, bomba de sódio da família das ATPases tipo P

nm: nanometro

NMDA: 1) N-metil-*D*-aspartato 2) receptor (ionotrópico) de glutamato que sofre agonismo por N-metil-*D*-aspartato

NO_2^-: nitrito

ºGL: Graus Gay-Lussac (concentração de álcool etílico em porcentagem volumétrica)

OMS: Organização Mundial de Saúde

P: 1) fosfato; 2) domínio de fosforilação da NKA

P1: primeira crise epiléptica convulsiva procursiva

P2: segunda crise epiléptica convulsiva procursiva

PE: polietileno

PET-CT: *positron emission tomography computadorized tomography*, i.e. tomografia computadorizada por emissão de pósitrons

pH: potencial hidrogeniônico

Phe: fenilalanina

P_i: fosfato inorgânico

PKC: *protein kinase C*, i.e. proteinocinase C

PLEDS: *pseudoperiodic lateralized epileptiform discharges*, i.e. descargas epileptiformes pseudoperiódicas lateralizadas

PM: peça de mão, um tipo de broca odontológica de baixa velocidade

PME: *progressive myoclonic epilepsy*, i.e. epilepsia mioclônica progressiva

PML: *progressive multifocal leukoencephalopathy*, i.e. leucoencefalopatia progressiva multifocal

PNET: *primitive neuroectodermal tumour*, i.e. tumor neuroectodérmico primitivo

PNH: *periventricular nodular heterotopia*, i.e. heterotopia nodular periventricular

PO: pós-operatório

prep.: preposição

pron.: pronúncia

PTZ: pentilenotetrazol

PVPI: iodo-polivinilpirrolidona

RE: reflexo de endireitamento

REDOX: redução-oxidação

s.: substantivo

s.c.: via subcutânea

SCA: *spinocerebellar ataxia*, i.e. ataxia espinocerebelar de início na infância

SE: *status epilepticus*

***SE*C**: status epilepticus convulsivo

***SE*NC**: status epilepticus não convulsivo

SERCA: *sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase*, i.e. cálcio-adenosina-trifosfatase do retículo sarcoplasmático, bomba de cálcio sarcoplasmática da família das ATPases tipo P

SNC: Sistema nervoso central

SPECT: *single photon emission computadorized tomography*, i.e. tomografia computadorizada por emissão de fóton único, uma técnica de imagenologia funcional

T: tálamo

t_1: primeiro marco temporal da definição operacional de *status epilepticus* de 2015

t_2: segundo marco temporal da definição operacional de *status epilepticus* de 2015

TBARS: *thiobarbituric acid reactive substances*, i.e. substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico indicador de lipoperoxidação, representadas majoritariamente pelo dialdeído malônico

TCE: trauma crânio-encefálico

TCG: (crise epiléptica) tônico-clônica generalizada

THB: transtorno do humor bipolar

TMS: *transcranial magnetic stimulation*, i.e. estimulação magnética transcraniana

TSC: *tuberous sclerosis complex*, i.e. complexo esclerose tuberosa

Tyr: tirosina

U: Unidade(s)

v: volume

v.: verbo

vídeo-EEG: vídeo-eletroencefalografia

VL: ventrículo cerebral lateral

$V_{máx}$: velocidade máxima

VNS: *vagus nerve stimulation* i.e. estimulação vagal

WAR: *Wistar audiogenic rat*, uma variante da cepa albina Wistar de *Rattus norvegicus* selecionada artificialmente para o fenótipo susceptível a crises epilépticas reflexas audiogênicas.

WBT: *whole body twitch*, i.e. sacudidela mioclônica de corpo inteiro (tipo sobressalto ou "*startle*")

WDS: *wet dog shake*, i.e. sacudidela tipo "cão molhado"

WFN: *World Federation of Neurology*

WRS: *wild running seizure*, i.e. crise convulsiva tipo corrida, uma forma de crise epiléptica convulsiva procursiva

α: 1) alfa; 2) subunidade alfa (catalítica, constitutiva) da adenosina-trifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio (Na^+,K^+-ATPase, NKA)

β: 1) beta; 2) subunidade beta (chaperona, constitutiva) da adenosina-trifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio (Na^+,K^+-ATPase, NKA)

γ: 1) gama; 2) terceira subunidade (= FXYD) (chaperona, de expressão variável) da adenosina-trifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio (Na^+,K^+-ATPase, NKA)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ……23

1.1 Crise epiléptica, convulsões, *status epilepticus (SE)* e epilepsias: revisão histórica e de literatura …..……23

1.1.1 Crise epiléptica …….....23

1.1.2 Convulsão.. ……...…23

1.1.3 Status epilepticus (*SE*) ……..…24

1.1.3.1 Etimologia ……..24

1.1.3.2 Epidemiologia ……..24

1.1.3.3 Evolução da definição de SE: da 1ª Classificação Internacional de 1969 à Classificação Operacional de 2015 ……25

1.1.3.3.1 Eixos para classificação do SE……..28

Eixo 1: Semiologia……30

Eixo 2: Etiologia……31

Eixo 3: Correlatos eletroencefalográficos……36

Eixo 4: Idade……37

1.1.4 Epilepsia ……...…38

1.1.4.1 Histórico e etimologia……38

1.1.4.2 Epidemiologia da Epilepsia……40

1.1.4.3 Definição Conceitual de Epilepsia …… ……40

1.1.4.4 Definição Operacional (clínica) de Epilepsia ……41

1.1.4.4.1 Epilepsia "resolvida": um novo conceito ……43

1.1.4.4.2 Consequências da nova Definição Operacional……45

1.1.4.5 Classificação Operacional de Crises: em fase de elaboração……47

1.1.4.6 Resolução sobre epilepsia da 68ª Assembleia Geral da Organização Mundial de Saúde: da campanha mundial de 1997 ao pacto de 2015….....48

1.2 Modelagem de crises epilépticas *in vivo* para estudo da ictogênese na pesquisa e desenvolvimento de fármacos com atividade antiepiléptica…….....50

1.3 Sódio-potássio adenosina trifosfatase, E.C. 3.6.1.37 (Na^+,K^+-ATPase, NKA)…...…….61

1.3.1 NKA: ciclo catalítico…….63

1.3.2 Ouabaína e esteróides cardiotônicos (ECT): estrutura molecular e interação com NKA.....64
1.3.3 ECTs exógenos: uma visão tradicional……..……67
1.3.4 ECTs endógenos: uma nova classe hormonal……....68
1.3.4.1 Interações proteína-proteína: NKA como um transdutor de sinal……69
1.4 Estresses oxidativo e nitrosativo……..….70
1.5 Justificativa e relevância……..….73

2 OBJETIVOS…….……78
2.1 Objetivo geral……..78
2.2 Objetivos específicos ……..…….……78

3 MATERIAL E MÉTODOS……....79
3.1 Animais: *Rattus norvegicus* Wistar machos adultos……79
3.2 Via de administração intracerebroventricular (*i.c.v.*): implantação do protocolo…….79
3.2.1 Manufatura das cânulas-guia, mandris e cânulas de infusão……..…80
3.2.2 Cirurgia estereotáxica……81
3.2.3 Indução da crise epiléptica…..……....84
3.2.3.1 Montagem do sistema de infusão……..…84
3.2.3.2 Infusão de ouabaína i.c.v……85
3.3 Desenho experimental……...…….....85
3.4 Eutanásia, remoção dos encéfalos, dissecção das áreas cerebrais e destino das carcaças.86
3.5 Análise comportamental das crises epilépticas *in vivo* ……..…….……87
3.6 Análise neuroquímica: estresses oxidativo e nitrosativo……..……89
3.6.1 Estresse oxidativo – Estimação da peroxidação lipídica pela concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado tálamo e mesencéfalo……..…89
3.6.2 Estresse oxidativo – Medida da concentração de glutationa reduzida (GSH) em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo ……89
3.6.3 Estresse nitrosativo – Medida da concentração de nitrito (NO_2^-) em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo ……89

3.7 Análise estatística dos dados……...……..…90

4 RESULTADOS……..……91
4.1 Etologia das crises epilépticas por ouabaína *i.c.v.* ……..……91
4.2 Estresses oxidativo e nitrosativo……..93
4.2.1 Efeito da ouabaína *i.c.v.* na lipoperoxidação em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo ……93
4.2.2 Efeito da ouabaína *i.c.v.* na concentração de glutationa em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo ……...….95
4.2.3 Efeito da ouabaína *i.c.v.* na concentração de nitrito em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo .....……...96

5 DISCUSSÃO…….98

6 CONCLUSÃO…….……104

REFERÊNCIAS……...105
ANEXO A - *Acokanthera sp.* ……...……117
ANEXO B - *Strophanthus sp.* ……..118

1. INTRODUÇÃO

1.1. Crise epiléptica, convulsões, *status epilepticus (SE)* e epilepsias: revisão de literatura

1.1.1. Crise epiléptica

Crise epiléptica é a *"ocorrência transitória de sinais ou sintomas* [motores (somáticos ou autonômicos) ou não motores (sensórios, cognitivos, emocionais)] *devidos à atividade neuronal anormal, excessiva ou sincrônica no cérebro"* (FISHER et al., 2005; FISHER, LEPPIK, 2008). Digno de nota é que tal conceito permanece essencialmente inalterado desde que por volta de 1873, John Hughlings Jackson, de maneira vanguardista, definiu crise epiléptica como *"sintoma de uma descarga ocasional, excessiva e desordenada do tecido nervoso cerebral"*, acerto confirmado seis décadas após, com o advento da eletroencefalografia por Hans Berger nos anos 1930 (informação verbal)[1]. Logo, uma crise epiléptica pode ou não constar de fenômenos motores evidentes (convulsões). Como exemplo típico de crise não-convulsiva, cita-se a crise epiléptica generalizada tipo ausência, que pode expressar-se como uma parada súbita do comportamento em curso que perdura alguns segundos, sem contrações musculares nem perda do tônus postural.

1.1.2. Convulsão

Convulsões são *"episódios de contração muscular anormal e excessiva, usualmente bilateral, que podem ser sustentadas ou interrompidas"* (BLUME et al., 2001). As convulsões são, portanto, fenômenos (sinais ou sintomas) motores somáticos que podem acompanhar a atividade neuronal anormal excessiva ou hiper-síncrona (crise epiléptica).

Convulsões de tipo clônica (ou mioclonia rítmica) consistem de contrações breves (<100 milisegundos), repetitivas, de baixa frequência (2-3 Hz) de um músculo ou grupo muscular em topografia vaiável (axial, apendicular proximal ou apendicular distal). Por seu turno, as convulsões tônicas consistem de contração muscular de intensidade crescente, durando de poucos segundos a minutos (BLUME et al., 2001). Um tipo de convulsão tônica que precede a fase clônica nas convulsões tônico-clônicas usualmente afeta grupos musculares apendiculares flexores e extensores simultaneamente. As convulsões atônicas envolvem uma súbita diminuição ou perda do tono muscular de duração ≥1-2 s envolvendo a cabeça/pescoço, mandíbula, tronco ou membros. Este tipo de crise pode culminar com perda do tono postural sendo incluída no grupo das crises astáticas ou *"drop attacks"* (ENGEL JR,

[1] Informação verbal: palestra de Peter Wolf, Ph.D., na 9th Latin-American Summer School on Epilepsy, São Paulo, 22/02/2015.

SCHWARTZKROIN, 2006; MOSHÉ et al., 2015). As convulsões tônico-clônicas generalizadas, antigamente chamadas "grande-mal", **cuja denominação atual é "tônico-clônica bilateral"**, consiste de contração tônica simétrica (fase tônica) seguida de contrações clônicas da musculatura somática (fase clônica) usualmente associada a fenômenos autonômicos (BLUME et al., 2001).

1.1.3. *Status epilepticus* (*SE*)

1.1.3.1. Etimologia

O termo "estado de mal epiléptico" ou *status epilepticus* (*SE*) é um latinismo cunhado no idioma Inglês para traduzir a expressão francesa *état de mal*, que foi empregada no século XIX para denominar o estado relativamente prolongado de certos pacientes do Hospital de Salpêtrière. Uma fala proferida por Trousseau (1868) numa de suas preleções no Hôtel Dieu sintetiza o pensamento da época: *"Durante o status epilepticus, quando a condição convulsiva é quase contínua, toma lugar algo de especial que requer explicação"* (TRINKA et al., 2015). A expressão é empregada com acepção equivalente em terminologias como "estado de mal enxaquecoso", "estado de mal asmático" etc.

1.1.3.2. Epidemiologia

O *SE* é uma das emergênicas neurológicas mais comuns, com uma incidência de 10-41/100.000 habitantes/ano e apresenta mortalidade de 20% (TRINKA et al., 2012), alcançando 40% (GARCIA GARCIA; GARCIA MORALES; MATÍAS GUIU, 2010) a 63% (FANG; WANG, 2015) nas formas farmacoresistentes. A incidência de *SE* é maior em regiões menos desenvolvidas e os números absolutos de casos chegam a 287.000 por ano só no continente Europeu. Cerca de 37-70% dos *SE* são formas convulsivas. **Menos de 50% dos pacientes com *SE* possui história pessoal pregressa de crises epilépticas ou epilepsia.** Em adultos com diagnóstico prévio de epilepsia, a maior causa de *SE* são os baixos níveis plasmáticos de fármacos antiepilépticos (que contam para no mínimo 25% da incidência total nesta população) seguidos de causas sintomáticas remotas e acidente vascular encefálico (AVC). **Em média, as causas sintomáticas agudas são a etiologia mais comum, contando para 48-63% dos casos.** O AVC é a mais importante causa sintomática aguda, contando para 14-22% (TRINKA; HÖFLER; ZERBS, 2012).

1.1.3.3 Evolução da definição de SE: da 1ª Classificação Internacional de 1969 à Classificação Operacional de 2015

Dada a definição de crise epiléptica como "ocorrência transitória de sinais/sintomas devidos à atividade neuronal anormal excessiva ou sincrônica no cérebro" e sendo o termo *"transitório"* usado como demarcador de tempo, com um início e um término claros, a definição histórica de *SE* como: "*uma condição caracterizada por uma crise epiléptica que persiste por tempo suficiente ou se repete com frequência suficiente para produzir uma condição fixa e duradoura"* (GASTAUT, 1970) veio publicada em um adendo à primeira Classificação de Crises Epilépticas que foi desenvolvida a partir de 1964, proposta por Henri Gastaut e colaboradores em 1969 e aprovada em assembleia pela International League Against Epilepsy (ILAE) no ano seguinte. O *SE* foi então classificado em parcial, generalizado ou unilateral, basicamente espelhando a classificação das crises epilépticas da publicação principal**.**

Novamente em um adendo da publicação principal da Classificação de Crises Epilépticas da ILAE de 1981, a definição de *SE* foi revisada e modificada minimamente para: *"crise epiléptica que persiste por tempo suficiente ou se repete com frequência suficiente para que não ocorra recuperação entre as crises"* (COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY, 1981). O adendo mencionava a diferença entre *SE* generalizado, *SE* parcial e *epilepsia partialis continua* (*EPC*), sem dar maiores detalhes. Tais conceitos, embora valiosos, eram imprecisos por não definirem o que seria *"tempo suficiente"* ou *"frequência suficiente"* para que uma crise fosse considerada *"fixa e duradoura"* nem estabeleceu a descrição clínica (semiologia) do tipo de crise, questões estas que não foram solucionadas pelos relatos do Grupo Central de Classificação. Anos após, a ILAE resolveu revisar a Classificação de Crises Epilépticas de 1981 e a composição da Comissão de Classificação e Terminologia e da Comissão de Epidemiologia.

Como as definições de *SE* pela ILAE não fornecessem uma definição precisa da duração do *SE*, diversas definições operacionais foram fornecidas em a, livros-texto e ensaios clínicos. O trabalho pioneiro de Meldrum e colaboradores (1973) sugeriu que atividade crítica contínua de 82 minutos ou mais pode causar dano neuronal irreversível em babuínos, o assim chamado *"seizure-induced damage"*, i.e. dano neuronal induzido pela crise epiléptica em si, o qual é atribuído a excitotoxicidade, distinto do dano direto induzido por agentes neurotóxicos. Esta observação levou à definição empírica e consensual de *SE* como "uma crise epiléptica com duração maior ou igual a 30 minutos". O racional subjacente a esta definição é que a lesão

neuronal irreversível deve ocorrer após 30 minutos de atividade de crise epiléptica contínua. Assim, tal definição permanece útil para estudos epidemiológicos concentrados em consequências e prevenção de *SE*. Não obstante, os clínicos conscienciosamente argumentaram a necessidade de iniciar o tratamento mais precocemente que 30 minutos, pois o prognóstico piora com o prolongamento da duração. Diversas sugestões de janelas temporais menores foram feitas, nenhuma das quais baseada em evidências de estudos prospectivos (TRINKA et al., 2015).

Esta indefinição foi abordada por Lowenstein e colaboradores (1999), evidenciando a discrepância entre o limitado conhecimento sobre a fisiopatologia e a necessidade de tratar prontamente os pacientes com *SE* e enfatizando a necessidade de duas definições de *SE*: uma "conceitual" (de pesquisa básica) e uma "operacional" (i.e. para efeitos práticos, clínicos). O *SE* tipo convulsivo generalizado em adultos e em crianças maiores de 5 anos foi operacionalmente definido como "*duração maior ou igual a 5 minutos de: 1) uma crise epiléptica contínua ou 2) duas ou mais crises epilépticas discretas entre as quais houve recuperação incompleta da consciência*" (LOWENSTEIN, BLECK, MACDONALD, 1999). Esta janela temporal tem sido amplamente aceita pela comunidade clínica e usada para nortear quando começar o tratamento de emergência do *SE* convulsivo generalizado. Como definição conceitual (básica), o Grupo Central de Classificação da ILAE sugeriu o seguinte: *"SE convulsivo generalizado refere-se a uma condição na qual há falha dos fatores "normais" que servem para terminar uma crise epiléptica tônico-clônica generalizada (TCG) típica"* (ENGEL, 2006). Embora tenha sido feita distinção entre a definição conceitual fundada em pesquisa básica e uma definição operacional, pragmática (clínica), para guiar o tratamento do *SE* convulsivo generalizado, outras formas de *SE* não foram abordadas.

Dados de populações com epilepsia refratária submetida a vídeo-eletroencefalografia (vídeo-EEG) indicam que a maioria das crises epilépticas convulsivas duram menos de 5 minutos. Em populações não selecionadas, os dados sugerem que a duração estimada de crises convulsivas maior que 5 minutos é muito mais incidente que o sugerido pela monitorização de pacientes e que mais de 10% das convulsões não provocadas dura mais de 30 minutos. A observação de uma população pediátrica menos selecionada revelou que há 2 subgrupos de pacientes: um com tendência a convulsões breves (<5 min) e outro, minoritário, propenso a convulsões prolongadas. O mesmo estudo evidenciou que uma convulsão que durasse mais de 7 minutos foi mais provável de tornar-se prolongada e assim requerer tratamento mais judicioso. Tomados em conjunto, estes achados levaram a Força-Tarefa a alcançar a opinião consensual

de que o trtatamento das crises epilépticas convulsivas generalizadas deve ser iniciado por volta dos 5 minutos (TRINKA et al., 2015).

Dada a evidência experimental indicando dano cerebral irreversível após convulsões prolongadas, sugeriu-se o tempo t_2 de 30 min no *SE* convulsivo generalizado tipo tônico-clônico, de acordo com definições previgentes de *SE* (BLUME et al., 2001; ENGEL, 2001; ENGEL, 2006). Embora em animais experimentais haja uma variação considerável na duração das convulsões prolongadas que resultam em dano cerebral, este ponto temporal foi definido como 30 minutos de modo a oferecer uma base para diretrizes seguras de prática clínica (GLAUSER et al., 2016). Há apenas informações limitadas para definir t_1 e t_2 em *SE* convulsivo focal e nenhuma informação sobre *SE* não convulsivo generalizado tipo ausência. Ademais, a probabilidade de dano depende da localização do foco epiléptico (inclusive em animais experimentais), da intensidade do *SE*, da idade do paciente e de outros fatores, havendo necessidade de pesquisas para melhor definir estes aspectos.

A Comissão de Classificação e Terminologia e a Comisão de Epidemiologia da ILAE foram encarregadas de formar a Força-Tarefa para Classificação do *status epilepticus* com a finalidade exclusiva de revisar seus conceitos, definição e classificação. A Força-Tarefa propôs uma definição que tenta abranger todos os tipos de *SE*, leva em consideração o atual conhecimento sobre fisiopatologia do *SE* e necessita abordar os pontos temporais de tomada de decisão na terapia clínica, bem como abordar a condução de estudos clínicos. A nova definição de *SE* proposta é:

> Status epilepticus é uma condição resultante ou da falha dos mecanismos responsáveis pela terminação da crise epiléptica ou da falha de iniciação destes mecanismos que leva a crises anormalmente prolongadas (após o ponto temporal t_1). Esta é uma condição que pode ter consequências de longo prazo (após o tempo t_2), incluindo lesão neuronal, morte neuronal e alteração de redes neuronais, dependendo do tipo e da duração das crises (TRINKA et al., 2015).

Segundo Trinka e colaboradores (2015), esta definição é conceitual, com dois pontos temporais (Tabela 1): 1) o ponto temporal t_1 a partir do qual a crise epiléptica deve ser olhada como "*anormalmente prolongada*" ou "*atividade crítica contínua*" e 2) o ponto temporal t_2 a partir do qual há risco de consequências de longo prazo devidas à contínua atividade da crise epiléptica. Tal definição com dois pontos temporais tem duas implicações clínicas (operacionais) claras: t_1 determina o tempo no qual o tratamento deve ser iniciado, enquanto que t_2 determina o quão agressivo deve ser o tratamento implantado para prevenir consequências de longo prazo tais como alterações cerebrais neurodegenerativas, psicopatologia, dano cognitivo e epilepsia. No caso do *SE* convulsivo generalizado tônico-

clônico, os pontos temporais, respectivamente 5 minutos e 30 minutos, são ambos baseados em pesquisa clínica e experimental e, embora sejam considerados a melhor estimativa baseada em evidências atualmente disponível, ainda assim são uma estimativa incompleta e sujeita a variações. Não estão disponíveis dados estimativos como estes para outros tipos de *SE* como o convulsivo tipo mioclônico, o convulsivo parcial (focal) nem para os *status* não convulsivos como o *status* de ausência e o *status* sutil, mas pesquisas clínicas e básicas estão sendo feitas neste campo e, na medida em que aumente o conhecimento baseado em evidências sobre tipos específicos de *SE*, espera-se incorporar tais estimativas à atual definição sem detrimento dos conceitos subjacentes. O domínio de tempo poderá variar consideravelmente entre diferentes formas de *SE*.

Tabela 1. Dimensões temporais da Classificação Operacional de *status epilepticus*

Tipo de *SE*	**Dimensão operacional**	
	t_1 – quando uma crise torna-se provável de prolongar-se	**t_2** – quando uma crise tem consequências a longo prazo
Generalizado tônico-clônico	5 min.	30 min.
Focal com consciência prejudicada	10 min.	> 60 min.
Generalizado tipo ausência	10-15 min.*	ignorado

* a evidência desta janela de tempo é limitada e dados futuros podem levar à sua revisão
Fonte: Trinka et al., 2015

1.1.3.3.1 Eixos para classificação do SE

Uma classificação deve servir a múltiplos propósitos: 1) facilitar a comunicação entre clínicos fornecendo-lhes uma linguagem comum; 2) ter classes clinicamente diferenciadas; 3) contribuir para melhorar o tratamento dos pacientes conforme o conhecimento baseado em evidências da fisiopatologia, prognóstico, etiologia e idade; 4) permitir a condução de estudos epidemiológicos de consequências e prevenção; 5) nortear a pesquisa básica na identificação das causas naturais (i.e. entidades ou doenças *strictu sensu*), o que, por seu turno, irá formar as bases de uma futura classificação científica verdadeira. Assim, avanços futuros nas pesquisas básica, clínica e epidemiológica deverão conduzir a revisões e modificações da classificação atual.

Uma classificação de *SE* não pode meramente espelhar a classificação de tipos de crises epilépticas, pois os sintomas e sinais podem variar dinamicamente durante o curso temporal do *SE* e frequentemente são diferentes quando comparados a sinais e sintomas em crises curtas e autolimitadas. Distúrbios neurológicos e a longa duração dos *SE* levam a variações em sua

apresentação clínica (i.e. semiologia). O *SE* não é uma entidade nosológica (doença) *per se*, mas um sinal ou sintoma com uma miríade de etiologias.

Assim, o propósito dos eixos diagnósticos é prover uma janela de diagnóstico clínico, invesigação e abordagem terapêutica para cada paciente. Em 1970, os eixos englobados foram: 1- tipo clínico de crise epiléptica (semiologia), 2- expressão eletroencefalográfica ictal e interictal, 3- substrato anatômico, 4- etiologia e 5- idade. Na revisão de 1981, os eixos foram reduzidos a: 1- tipo clínico de crise e 2- expressão elegtroencefalográfica ictal e interictal.

Pelo menos metade dos pacientes com *SE* não tem epilepsia ou síndromes epilépticas específicas – eles tem *SE* devido a doença sistêmica ou do sistema nervoso central (SNC). Assim, os eixos usados previamente na classificação de crises epilépticas necessitam ser modificados para a classificação dos *SE* (TRINKA et al., 2015).

Anova definição propõe um "sistema diagnóstico de classificação" que oferece oportunidades de diagnóstico clínico, investigação e abordagem terapêutica para cada tipo de paciente. O sistema atual possui quatro eixos (Quadro 1): 1- semiologia, 2- etiologia, 3- correlatos eletroencefalográficos, 4- idade do paciente. O eixo 1 - semiologia lista as diversas formas de *SE* divididos em duas grandes categorias: a) aqueles com sinais motores proeminentes e b) aqueles sem sinais motores proeminentes que inclui condições atualmente indeterminadas (tais como os estados confusionais agudos com padrões eletrográficos epileptiformes). O eixo 2 - etiologia é dividido em subcategorias com causas conhecidas e causas desconhecidas. O eixo 3 - correlatos eletroencefalográficos adota as recomendações mais recentes de consensos para descrever as características do eletroencefalograma (EEG): nome do padrão, morfologia, localização, características relacionadas ao tempo, modulação e efeito de intervenções. Finalmente o eixo 4- (idade) divide os grupos em: a) neonatal, b) infantil 1, c) infantil 2, d) adolescente, e) adulto e f) idoso.

Quadro 1. Eixos para classificação do *status epilepticus*:

1	Semiologia
2	Etiologia
3	Correlatos eletrográficos
4	Idade

Fonte: Trinka et al., 2015

Idealmente cada paciente deve ser categorizado de acordo com cada um dos eixos, embora nem sempre seja possível. Na apresentação, a semiologia e idade aproximada são imediatamente acessíveis. A etiologia pode estar evidente com menor frequência e pode

consumir algum tempo até ser identificada. Sabe-se que o registro de EEG não será disponível na maioria das situações, particularmente à apresentação. Todavia o EEG irá afetar a escolha e a agressividade do tratamento, a abordagem clínica e o prognóstico, de modo que o EEG deve ser providenciado o mais precocemente possível. De fato, algumas formas clínicas de *SE* somente podem ser diagnosticadas por meio de eletroencefalografia. Assim como em outras condições neurológicas, **a semiologia (sinais e sintomas) e o padrão eletrográfico nos *SE* pode ser altamente dinâmico e mudar claramente em curtos períodos em um dado paciente. Portanto, o exame neurológico e o EEG repetidos de maneira seriada em pacientes com *SE* pode levar a diferentes classificações** (TRINKA et al., 2015)**.** Por exemplo, o *SE* pode começar com sintomas motores focais evoluindo com *SE* convulsivo bilateral (tab. A.1.b) e pode apresentar-se poucas horas após como *SE* não-convulsivo (SENC) cursando com rebaixamento do nível de consciência ou coma e fenômenos motores pouco evidentes, assemelhando-se ao assim chamado "*status* sutil" (B.1). De maneira semelhante, o EEG pode exibir descargas epileptiformes periódicas lateralizadas ("*periodic lateralized epileptiform discharges"* - PLEDS) ao início e um padrão bilateral síncrono numa segunda investigação.

Eixo 1: Semiologia

Segundo Gastaut (1970) *"para cada tipo (semiológico) de crise epiléptica, existe um tipo de SE correspondente"*; entretanto reconhece-se hoje que a semiologia do *SE* pode assumir características altamente dinâmicas e tornando os sinais e sintomas de um *SE* diferentes daqueles das crises epilépticas autolimitadas de curta duração. De fato, uma crise epiléptica pode iniciar com sinais e sintomas motores exuberantes que, com o prolongamento da crise, podem tornar-se sutis ou mesmo inexistentes, evoluindo como um *SE* não convulsivo.

O eixo **1-Semiologia** (Tabela 2) refere-se à apresentação clínica do SE e assim constitui a coluna dorsal da classificação de 2015. Há dois critérios taxonômicos principais, a saber:

1. Presença ou ausência de fenômenos motores proeminentes.
2. Grau (quali- e quantitativo) de comprometimento da consciência.

As formas com sinais motores proeminentes e comprometimento da consciência devem ser sumarizadas como "*SE convulsivo*" em oposição às formas de "*SE não convulsivo*" (SENC). Embora o termo "*convulsão*", ao menos no idioma Inglês, seja geralmente relegado como vocábulo leigo, ele reflete a linguagem clínica corriqueira. Assim, a Classificação da ILAE de 2015 resolveu manter o termo "*convulsivo*" devido à sua aceitação e uso clínicos bastante difundidos. O termo "*convulsivo*" denomina, como sobredito, "*episódios de contração*

muscular anormal e excessiva, usualmente bilateral, que podem ser sustentados ou interrompidos" (BLUME et al., 2001).

Tabela 2. Eixo 1: Semiologia do *status epilepticus*

A – Com sintomas/sinais motores proeminentes
A.1 *SE* convulsivo (*SE*C, *SE* tônico-clônico)
A.1.a. Generalizado convulsivo
A.1.b. Início focal evoluindo em *SE* convulsivo bilateral
A.1.c. Desconhecido se focal ou generalizado
A.2 *SE* mioclônico (sacudidelas mioclônicas proeminentes)
A.2.a. Com coma
A.2.b. Sem coma
A.3 Motor focal
A.3.a. Crise epiléptica motora focal repetida (Jacksoniana)
A.3.b. *Epilepsia partialis continua* (*EPC*)
A.3.c. *Status* adversivo
A.3.d. *Status* oculoclônico
A.3.e. Paresia ictal (i.e. *SE* inibitório focal)
A.4 *Status* tônico
A.5 *SE* hipercinético
B – Sem sinais/sintomas motores proeminentes (i.e. *SE* não-convulsivo, *SE*NC)
B.1 *SE*NC com coma (inclui "*status* sutil")
B.2 *SE*NC sem coma
B.2.a. Generalizado
B.2.a.a. *Status* de ausência típica
B.2.a.b. *Status* de ausência atípica
B.2.a.c. *Status* de ausência com mioclonias
B.2.b. Focal
B.2.b.a. Sem prejuízo da consciência (aura contínua com sintomas autonômicos sensórios, visuais, olfatórios, gustatórios, emocionais/psíquicos/experienciais ou auditivos)
B.2.b.b. *Status* afásico
B.2.b.c. Com prejuízo da consciência
B.2.c. Ignorado se focal ou generalizado
B.2.c.a. *SE* autonômico

Fonte: Trinka et al., 2015

Eixo 2: Etiologia

A causa subjacente (etiologia) do *SE* (Tabelas 3 e 4) é categorizada de maneira consistente com os conceitos propostos pela Comissão de Classificação da ILAE de 2010 (BERG et al., 2010), mas reconhece os termos bem estabelecidos na prática clínica de epileptologistas, neurologistas, emergencistas, intensivistas, neurocirurgiões, neuro-pediatras, médicos da família e comunidade entre outras especialidades em respeito a pacientes com *SE*.

O termo "*sintomático*" ou "*causa conhecida*", consoante a terminologia neurológica comum, é usado para o *SE* causado por um distúrbio conhecido, que pode ser estrutural,

infeccioso, inflamatório, metabólico, tóxico, ou genético. Apoiado em sua relação temporal, as subdivisões em agudo, remoto e progressivo podem ser aplicadas.

Tabela 3. Eixo 2: Etiologia dos *status epilepticus*

1. Conhecida (= sintomático)
    1.1. Agudo (e.g.: acidente vascular encefálico (AVC), intoxicação, distúrbio metabólico, encefalite, malária)
    1.2. Remoto (e.g.: pós-traumático, pós-encefalítico, pós-AVC)
    1.3. Progressivo (e.g.: tumor encefálico, demências, doença de Lafora e outras epilepsias mioclônicas progressivas (PMEs – *progressive myoclonic epilepsies*))
2. Desconhecida (= criptogênico)

Fonte: Trinka et al., 2015

Quadro 2. Condições atualmente indeterminadas (ou "síndromes limítrofes")

Encefalopatias epilépticas
Coma com padrão eletroencefalográfico não evolutivo*
Distúrbio comportamental (e.g.: psicose) em paciente com epilepsia
Estado confusional agudo (e.g.: delirium) com padrão eletroencefalogáfico epileptiforme

* Descargas epileptiformes periódicas lateralizadas ou generalizadas com aparência monótona não são consideradas como padrão eletroencefalográfico evolutivo

Fonte: Trinka et al., 2015

O termo "*idiopático*" ou "*genético*" não é aplicável à etiologia subjacente ao *SE*. Nas síndromes epilépticas idiopáticas ou genéticas, a causa do *SE* não é a mesma da doença, mas sim alguma causa tóxica, metabólica ou fator intrínseco (como deprivação de sono) que pode deflagrar o *SE* nestas síndromes. Assim, o termo "*idiopático*" ou "*genético*" não é usado para referir-se a *SE*. Com efeito, em um paciente com epilepsia mioclônica juvenil (EMJ), a qual é "*idiopática*" ou "*genética*" *per se*, o *SE* pode ser "*sintomático*" devido a má adesão à posologia dos medicamentos antiepilépticos, a descontinuação abrupta destes ou a fármaco-toxicidade.

O termo "*criptogênico*" (do Grego *κρύπτος*, oculto, incógnito + *τὸ γένος*, família, clã, ascendência, origem, classe, ordem) é usado na acepção estrita e primitiva do vernáculo como "*de causa desconhecida*". A hipótese de que o *SE* pode ser "presumivelmente sintomático ou genético" é inadequada.

Tabela 4. Eixo 2: Etiologia. Lista das etiologias conhecidas de *status epilepticus*

1. Doenças cerebrovasculares
   1.1. Acidente vascular encefálico isquêmico (AVCI)
   1.2. Hemorragia intracerebral (intraparenquimatoso, intraventricular)
   1.3. Hemorragia subaracnóidea
   1.4. Hematoma subdural
   1.5. Hematoma epidural
   1.6. Trombose de seios venosos e trombose venosa cortical
   1.7. Síndrome de leucoencefalopatia posterior reversível
   1.8. Demência vascular
2. Infecções do sistema nervoso central
   2.1. Meningite bacteriana aguda
   2.2. Meningite bacteriana crônica
   2.3. Tuberculose
   2.4. Infecções bacterianas atípicas Encefalite viral (inclui encefalite B japonesa, encefalite por herpes simplex e por herpesvírus humano 6)
   2.5. Leucoencefalopatia progressiva multifocal (PML - *progressive multifocal leukoencephalopathy*)
   2.6. Panencefalite esclerosante subaguda
   2.7. Encefalite progressiva pelo vírus da rubéola
   2.8. Neurocisticercose
   2.9. Toxoplasmose
   2.10. Malária cerebral
   2.11. Protozooses
   2.12. Micoses
   2.13. Doenças relacionadas ao HIV
   2.14. Doenças priares (Kreutzfeld-Jakob, Gerstmann-Sträussler-Scheinker, kuru, insônia fatal familiar)
3. Doenças neurodegenerativas
   3.1. Doença de Alzheimer (DA)
   3.2. Degeneração corticobasal
   3.3. Demência frontotemporal
4. Tumores intracranianos
   4.1. Gliomas
   4.2. Meningiomas
   4.3. Metástases
   4.4. Linfomas
   4.5. Meningeose neoplásica
   4.6. Ependimoma
   4.7. Tumor neuroectodérmico primitivo (PNET - *primitive neuroectodermal tumour*)
5. Displasias corticais
   5.1. Displasia cortical focal (FCD - *focal cortical dysplasia*) tipo II, Complexo esclerose tuberosa (TSC - *tuberous sclerosis complex*), hemimegalencefalia, hemihemimegalencefalia
   5.2. Ganglioglioma, gangliocitoma, tumor neuroepitelial disembrioplásico (DNET - *dysembryoplastic neuroepithelial tumour*)
   5.3. Heterotopia nodular periventricular (PNH - *periventricular nodular heterotopia*) e outras heterotopias nodulares

(continua)

(continuação)

Tabela 4. Eixo 2: Etiologia. Lista das etiologias conhecidas de *status epilepticus*

- 5.4. Espectro de heterotopia em banda subcortical
- 5.5. Lisencefalia
- 5.6. Polimicrogirias familial e esporádica
- 5.7. Esquizencefalias familial e esporádica
- 5.8. Malformações infratentoriais (e.g.: displasia denteada, displasia mamilar)

6. Trauma cefálico
   - 6.1. Trauma craniano fechado
   - 6.2. Trauma craniano aberto
   - 6.3. Trauma craniano penetrante
   - 6.4. Relacionadas ao álcool
7. Intoxicação por etanol
   - 7.1. Retirada de etanol
   - 7.2. Encefalopatia tardia por etanol com convulsões
8. Encefalopatia de Wernicke
9. Intoxicações
   - 9.1. Neurotoxinas
   - 9.2. Intoxicação medicamentosa
   - 9.3. Metais pesados
10. Descontinuação ou baixos níveis plasmáticos de fármacos antiepilépticos
11. Hipóxia ou anóxia
12. Distúrbios metabólicos (e.g. desequilíbrios hidroeletrolíticos, distúrbios ácido-básicos, distúrbios da glicemia, insuficiência renal, encefalopatia hepática, falência orgânica, encefalopatia actínica etc.)
13. Distúrbios autoimunes
    - 13.1. Esclerose múltipla
    - 13.2. Encefalite paraneoplásica (e.g.: encefalite límbica)
    - 13.3. Encefalite de Hashimoto
    - 13.4. Encefalite por anticorpo anti-receptor NMDA
    - 13.5. Encefalite por anticorpo anti-canal de potássio ativado por voltagem (inclui encefalite por anticorpos anti-proteína 1 rica em leucina inativada em glioma (anti-LGI1))
    - 13.6. Encefalite associada a anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD)
    - 13.7. Encefalite por anticorpo anti-receptor AMPA
    - 13.8. Encefalite autoimune soronegativa
    - 13.9. Encefalite de Rasmussen
    - 13.10. Lúpus cerebral (acometimento cerebral no lúpus eritematoso sistêmico)
    - 13.11. Síndrome CREST (*calcinosis, Raynaud phenomenon, oesophageal dysmotility, sclerodactyly, telangiectasia*)
    - 13.12. Doença de Still de início no adulto
    - 13.13. Síndrome e Goodpasture
    - 13.14. Púrpura trombocitopênica trombótica (púrpura de Henoch-Schönlein e na síndrome de Moschcowitz)
14. Doenças mitocondriais
    - 14.1. Doença de Alpers
    - 14.2. Síndrome de Leigh

(continua)

(continuação)

Tabela 4. Eixo 2: Etiologia das etiologias conhecidas de *status epilepticus*

14.3. Encefalopatia mitocondrial, acidose lática e episódios tipo-AVC (MELAS - *mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes*)
14.4. Encefalopatia mioclônica com fibras vermelhas esfarrapadas (MERF - *myoclonic encephalopathy with ragged red fibers*)
14.5. Neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa (NARP)
15. Doenças mitocondriais
15.1. Doença de Alpers
15.2. Encefalopatia mitocondrial, acidose lática e episódios tipo-AVC (MELAS - *mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes*)
15.3. Síndrome de Leigh
15.4. Encefalopatia mioclônica com fibras vermelhas esfarrapadas (MERF - *myoclonic encephalopathy with ragged red fibers*)
15.5. Neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa (NARP)
16. Aberrações cromossômicas e anomalias genéticas
16.1. Comossomo 20 cíclico
16.2. Síndrome de Angleman
16.3. Síndrome de Wolf-Hirshhorn
16.4. Síndrome do X frágil
16.5. Síndrome de retardo mental ligado ao X
16.6. Cromossomo 17 cíclico
16.7. Síndrome de Rett
16.8. Síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21)
17. Síndromes neurocutâneas
17.1. Síndrome de Sturge-Weber
18. Distúrbios metabólicos
18.1. Porfirias
18.2. Doença de Menkes
18.3. Doença de Wilson
18.4. Doença de Alexander
18.5. Adrenoleucodistrofia
18.6. Deficiência de cobalamina C/D
18.7. Deficiência de ornitina transcarbamilase
18.8. Hiperprolinemia
18.9. Doença da urina em xarope de bordo
18.10. Deficiência de 3-metilcrotonil Coenzima Atranscarbamilase
18.11. Intolerância protéica lisinúrica
18.12. Acidúria hidroxiglutárica
18.13. Leucodistrofia metacromática
18.14. Lipofuscinose ceróide neuronal (tipos I, II e III, incluindo doença de Kufs)
18.15. Doença de Lafora
18.16. Doença de Unverricht-Lundborg
18.17. Sialidose (tipos I e II)
18.18. Doença de Gaucher
18.19. Deficiência de beta-ureidopropionase
18.20. Deficiência de 3-hidroxiacil Coenzima A desidrogenase
18.21. Deficiência de carnitina palmitoiltransferase

(continua)

(continuação)

Tabela 4. Eixo 2: Etiologia. Lista das etiologias conhecidas de *status epilepticus*

18.22.	Deficiência de semialdeído succínico desidrogenase
19. Outros	
19.1.	Migrânia hemiplágica familiar
19.2.	Ataxia espinocerebelar de início na infância (SCA)
19.3.	Síndrome da pele enrugada
19.4.	Melanomatose neurocutânea
19.5.	Mutações da neuroserpina
19.6.	Síndrome de Wolfram
19.7.	Hiperecplexia autossômica recessiva
19.8.	Síndrome de Cockayne
19.9.	Arteriopatia autossômica dominante com infartos corticais e leucoencefalopatia (CADASIL - *cerebral autosomal dominant arteriopathy with cortical infarcts and leukoencephalopathy*)
19.10.	Síndrome de Robinow
19.11.	Hiperpirexia maligna
19.12.	Doença de Huntington juvenil (variante Westphal)

(conclusão)

Fonte: Trinka et al., 2015

Eixo 3: Correlatos eletroencefalográficos.

Nenhum dos padrões ictais de EEG em nenhum dos tipos de *SE* é específico. As descargas epileptiformes são consideradas como "marcas registradas", mas com o prolongamento do curso do *SE*, o traçado do EEG muda e padrões rítmicos não epileptiformes podem prevalecer. Padrões eletrográficos semelhantes, como as ondas trifásicas, podem ser registrados em diversas condições patológicas, produzindo considerável confusão na literatura. Embora o EEG possa ser sobrecarregado com o movimento e e artefatos da contração muscular nas formas convulsivas de *SE*, o que pode limitar seu valor clínico, ele permanece imprescindível ao diagnóstico de *SE* não-convulsivo, pois nestas formas os sinais clínicos, quando existem, são demasiado sutis e inespecíficos. Avanços nas técnicas de eletrofisiologia poderão num médio prazo aumentar a disponibilidade do EEG nos serviços de emergência e permitir melhor delineamento das mudanças altamente dinâmicas dos padrões eletroencefalográficos.

Atualmente não são disponíveis critérios de diagnóstico eletroencefalográfico de *SE* baseados em evidência. **Não obstante, com base em grandes séries descritivas e painéis de consenso, a Classificação de *SE* de 2015 propõe a seguinte terminologia (Tabela 5) para descrever os padrões eletrográficos no *SE*** (TRINKA et al., 2015):

Tabela 5. Eixo 3: Correlatos eletroencefalográficos

1	**Localização**: generalizado (inclui padrões bilaterais síncronos), lateralizado, bilateral independente, multifocal
2	**Nome do padrão**: Descargas periódicas, atividade rítmica delta ou espícula-onda/ponta-onda extra mais subtipos
3	**Morfologia**: comprimento de onda, número de fases (e.g.: morfologia trifásica), amplitudes absoluta e relativa, polaridade
4	**Características tempo-relacionadas**: prevalência, frequência, duração, duração e índice do padrão diário, início (súbito *versus* gradual) e dinâmica (evolutivo, flutuante ou estático)
5	**Modulação**: espontâneo *versus* induzido por estímulo
6	**Efeito de intervenções** (fármacos) sobre o padrão

Fonte: Trinka et a., 2015

Eixo 4: Idade

As causas mais incidentes de *SE* variam segundo a faixa etária (Tabela 6), influenciando de maneira determinante o prognóstico a abordagem terapêutica. Citam-se expemlos de síndromes eletroclínicas distribuídos por idade na Tabela 7.

Tabela 6. Eixo 4: Faixa etária

Grupo 1	Neonatal: 0-30 dias
Grupo 2	1ª Infância: 1 mês a 2 anos
Grupo 3	2ª Infância: >2 anos a 12 anos
Grupo 4	adolescência e idade adulta: >12 a 59 anos
Grupo 5	Idoso: ≥ 60 anos

Fonte: Trinka et al., 2015

Tabela 7. Eixo 4: Faixa etária. Exemplos de síndromes eletroclínicas distribuídos por idade

1. *SEs* que ocorrem principalmente nas idades neonatal e 1ª infância
   1.1. *Status* tônico
   1.2. *Status* mioclônico na síndrome de Dravet
   1.3. *Status* focal
   1.4. *SE* febril
2. *SE*s que ocorrem principalmente na 2ª infância e adolescência
   2.1. *SE* autonômico na epilepsia occipital infantil de início precoce (Síndrome de Panayiotopoulos)
   2.2. *SE*NC em epilepsias e etiologias específicas da infância (*e.g.:*) Cromossomo 20 cíclico e outras anormalidades cariotípicas, síndrome de Angleman, epilepsia com crises mioclônico-atônicas, outras encefalopatias mioclônicas da infância
   2.3. *SE* tônico na síndrome de Lennox-Gastaut
   2.4. *SE* mioclônico nas epilepsias mioclônicas progressivas
   2.5. *SE* elétrico no sono de ondas lentas

(continua)

(continuação)

Tabela 7. Eixo 4: Faixa etária. Exemplos de síndromes eletroclínicas distribuídos por idade

2.6. *SE* afásico na síndrome de Landau-Kleffner
3. *SEs* que ocorrem principalmente na adolescência e idade adulta
3.1. *Status* mioclônico na epilepsia mioclônica juvenil (EMJ)
3.2. *Status* de ausência na epilepsia de ausência juvenil
3.3. *Status* mioclônico na síndrome de Down
4. *SEs* que ocorrem principalmente na idade avançada
4.1. *Status* mioclônico na DA
4.2. *SE*NC na doença de Creutzfeld-Jakob
4.3. *Status* de ausência *de novo* ou recaída na vida tardia

Fonte: Trinka et al., 2015

O *SE* em neonatos pode ser sutil e difícil de reconhecer. Algumas formas de *SE* são vistas como parte integrante de certas síndromes eletroclínicas, ou quando fatores desencadeantes ou causas precipitantes estão presentes, como deprivação de sono, intoxicação medicamentosa ou medicação inapropriada. Exemplos disto são a fenitoína em algumas formas de epilepsia mioclônica progressiva, a carbamazepina na EMJ e nas epilepsias tipo de ausência.

1.1.4. Epilepsia

1.1.4.1 Histórico e etimologia

A descrição mais antiga conhecida de uma crise epiléptica consta num tablete de argila em dialeto Acádio proveniente da Mesopotâmia datado de *c.* 2000 a.C.:

> "Seu pescoço vira para a esquerda, as mãos e os pés tornam-se tensos, os olhos abrem-se amplamente e de sua boca flui espuma sem que tenha consciência de nada. O exorcista, que diagnosticou a condição 'antasubbû', que significa 'a mão do pecado', trouxe seu apelo sob o deus da Lua." (MAGIORKINIS et al.,, 2010)

O *Sakikku* (= "todas as doenças"), um dos mais antigos textos médicos da Babilônia (*c.* 1067-1046 a.C) traz os termos de *antasubba* e *miqtu*, equivalentes a "crise epiléptica", descreve sintomas de aura epiléptica, crises parciais com e sem prejuízo da consciência (no passado ditas focais simples e complexa, respectivamente), crise generalizada e narcolepsia, enfocando os diagnósticos e prognósticos e dando menos atenção às terapias. Também o Código de Hamurábi (1790 a.C.) menciona a doença.

Na Índia, o médico Atreya (séc. VI a.C) no tratado *Caraka Samhitā Sutra* definiu: epilepsia e atribuiu sua causa a uma disfunção do cérebro, descreveu sintomas premonitórios

de crise epiléptica e distinguiu quatro tipos de crise um dos quais, *abasmara*, consistia de perda de memória.

Na Grécia, autores pré-hipocráticos descreveram a epilepsia sob diversas denominações: "doença hercúlea", "doença sagrada" e *σεληνιασμός* (pron. seleniasmos) derivado de de *σελήνη* (pron. selenê = *s*. Lua). Um destes autores, Heráclito de Éfeso (535-475 a.C) cunhou a expressão "doença sagrada" a qual originalmente não se referia especificamente à epilepsia. O termo epilepsia tem origem no vocábulo Grego *ἐπιλειψία* (pron. epilēipsía) oriundo de *ἐπιλαμβάνω* (pron. epilambáno = *v*. eu apreendo), derivado das raízes *ἐπί-* (pron. epí, = *prep*. sobre) + *λαμβάνω* (pron. lambáno = *v*. eu apreendo, eu tomo), forma ativa do particípio passado passivo *λαμβάνομαι* (pron. lambánomai, = *v*. ter sido apreendido, preso, tomado, atacado, abatido), significando literalmente o ato ou efeito de pôr as mãos sobre algo, parar subitamente, abater, assaltar, interceptar, atacar.

O médico grego Alcméon de Cróton (século VI a.C) foi o primeiro dentre os clássicos a imputar o cérebro como órgão alvo da epilepsia por observar o prejuízo da consciência na crise epiléptica e por crer que o cérebro era o sítio anatômico da memória, do pensamento, dos sentidos e do espírito, visão apoiada por Demócrito de Abdera (século V a.C.), mais notabilizado pela sua teoria atômica, no livro "Sobre a Epilepsia". Hipócrates II de Kós (c. 460-370 a.C) no conhecido tratado "Sobre a Doença Sagrada" refutou a origem divina da doença, mas por outro lado prescreveu rituais religiosos específicos conforme o tipo semiológico de crise, o sexo e a idade do paciente:

> Esta doença (a epilepsia), na minha opinião, não é mais divina que qualquer outra; ela tem a mesma natureza e a mesma causa que dá origem às outras em particular […] Minha própria visão é que aqueles que primeiro atribuíram um caráter sagrado a esta doença eram como os magos, os purificadores e os charlatães de nossos dias, homens que afirmam grande piedade e superior conhecimento, sendo isto um prejuízo pois, não havendo tratamento que ajude, eles escondem-se e se abrigam detrás da superstição, e chamam esta doença de sagrada a fim de que a sua completa ignorância não seja manifesta (MAGIORKINIS et al., 2010)

O Latim clássico chama as crises epilépticas de *morbus comitialis*, pois os romanos tinham-nas como sinal de mau presságio e interrompiam ou adiavam as reuniões (comícios) quando algum membro do Senado entrava em crise (MAGIORKINIS et al., 2010). O termo *mal comitial* é por isso ainda extensivamente usado em Francês tanto na linguagem leiga como na clínica.

O grecismo *epilēpsia* no Latim tardio originou o termo *epilence* no idioma Francês medieval do século XIII; e o termo técnico *épilepsie* ressurgiu durante o período humanista-renascentista no século XVI em traduções francesas de textos clássicos. Data da época (*c.* 1570)

a definição do termo pelo cirurgião Ambroise Paré: *"Épilepsie signifie surprise ou retention de tous les sentiments […]"*[2] (GASTAUT E MIKOL, sem data); daí o termo foi vertido para os demais idiomas.

1.1.4.2 Epidemiologia da Epilepsia

As epilepsias são um grupo heterogêneo de doenças que constituem um problema de saúde pública afetando cerca de 65 milhões de pacientes ao redor do mundo (MOSHÉ et al., 2015). A doença incide em 24 a 82/100.000 habitantes/ano e 44 a 162/ 100.000 habitantes/ano na Europa e nos Estados Unidos respectivamente (BEHR, 2016). A epilepsia é a condição neurológica mais comum com prevalência de 0,5-1% da população mundial (HART, 2012), concentrando-se em países subdesenvolvidos em decorrência da maior incidência de etiologias infecciosas e parasitárias bem como do trauma mecânico nestas regiões do globo.

Cerca de 2-5% das pessoas em todo o mundo já tiveram ou terão pelo menos uma crise epiléptica ao longo da vida; não obstante apenas 33% delas desenvolverão as crises recorrentes que caracterizam a epilepsia (BEHR, 2016). Aproximadamente 50% das pessoas que tem uma crise epiléptica sofrerão recorrência nos dois anos subsequentes (HART, 2012). A prevalência deste grupo de doenças é bimodal, atingindo picos nas faixas etárias pediátrica e idosa. A mortalidade cumulativa até os 45 anos é de 25% das pessoas que desenvolve epilepsia na infância (BEHR et al., 2016). O custo social, econômico e pessoal desta doença deve-se preponderantemente às crises não controladas, o que sublinha a necessidade de mais pesquisas em novas abordagens de diagnóstico, tratamento e prevenção da epilepsia e de suas consequências (ENGEL JR, SCHWARTZKROIN, 2006).

1.1.4.3 Definição Conceitual de Epilepsia

Em 2005 International League Against Epilepsy (ILAE) formulou a definição conceitual de epilepsia:

> Epilepsia é um distúrbio do cérebro caracterizado pela predisposição duradoura a gerar crises epilépticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais desta condição. Esta definição requer a ocorrência de ao menos uma crise epiléptica (FISHER et al., 2005).

[2] Citação completa: *"Épilepsie signifie surprise ou retention de tous les sentiments. - On le nomme aussi le mal Saint-Jean, pource que la teste de Saint Jean cheut en terre lorsqu'il fut decapité, puis posée dedans un plat à l'appétit d'Hérodias." (PARÉ,* VIII, 25*)*: "Epilepsia significa suspensão ou retenção de todos os sentidos. – Chama-se-lhe também de mal-de-São-João porque a cabeça de São João caiu em terra quando ele foi decapitado, e depois foi posta em um prato ao gosto de Herodíades."

Para propósitos práticos, esta definição conceitual vigente até 2013 costuma ser translacionada na clínica como *"duas crises não provocadas em um intervalo maior que 24 horas"*.

Entretanto alguns epileptologistas tem reconhecido e argumentado a necessidade de abordar circunstâncias com alto risco de futuras crises após uma única crise epiléptica não provocada. Como exemplo, citam-se e as crises reflexas (por estimulação fótica) e as crises *de novo* em sujeitos com lesão cerebral estrutural. Assim, uma decisão por tratar não necessariamente equivale ao diagnóstico de epilepsia, mas pode ser tida como uma crença em uma predisposição forte e duradoura de mais crises epilépticas. Por outro lado, o diagnóstico de epilepsia não necessariamente exigirá tratamento (FISHER, LEPPIK, 2008; FISHER et al., 2014).

Ademais, pacientes, cuidadores e profissionais de saúde tem questionado se seria adequado considerar portador de epilepsia o indivíduo com uma síndrome epiléptica idade dependente que tenha superado a faixa etária aplicável (caso da epilepsia infantil com crises generalizadas tipo ausência típica) ou o indivíduo que permanece livre de crises após anos sem usar medicamentos antiepilépticos. Em realidade, alguns indivíduos adultos tidos como sãos esquecem-se de seu histórico de crises epilépticas na infância. Apesar disto, a definição vigente até 2013 não admitia o conceito de que o paciente pudesse superar a epilepsia.

Considerando tais questões irresolvidas, evidenciou-se a necessidade de uma definição que harmonizasse o que pensam os clínicos, os cuidadores e os pacientes e se sobrepusesse com outras considerações individuais na tentativa de auxiliar a tomada de decisões terapêuticas. A ILAE encarregou uma Força-Tarefa de formular uma definição operacional de epilepsia para propósitos de diagnóstico clínico. A proposta foi aprovada em assembleia como posição da ILAE em dezembro de 2013 e publicada no ano seguinte (FISHER et al., 2014).

1.1.4.4 Definição Operacional (clínica) de Epilepsia

A epilepsia existe em um indivíduo que teve uma crise epiléptica e cujo cérebro, por uma razão qualquer, demonstra uma tendência patológica duradoura de ter convulsões recorrentes. Esta tendência pode ser imaginada como um rebaixamento patológico do limiar de crise epiléptica quando comparado a pessoas sem a condição. Uma crise epiléptica provocada por um fator transitório atuando em um cérebro que de outra maneira seria normal e baixando temporariamente o limiar não conta para diagnóstico de epilepsia (FISHER et al., 2014).

O termo “crise epiléptica provocada” pode ser considerada como sinônimo de “crise epiléptica reativa” ou “crise aguda sintomática”. Uma crise epiléptica após uma concussão, durante febre, ou em associação com retirada de álcool, exemplificam crises provocadas que não implicam diagnóstico de epilepsia. A etiologia não deve ser confundida com fatores provocantes e algumas etiologias irão produzir uma tendência duradoura a ter convulsões. Um tumor cerebral, por exemplo, pode causar uma crise epiléptica, mas não como insulto transitório (FISHER et al., 2014).

A condição de crises reflexas recorrentes, “provocadas”, por exemplo em resposta a estímulo fótico, representa crises epilépticas que são agora classificadas como epilepsia. O termo “não-provocado” implica ausência de um fator temporário ou reversível baixando o limiar e produzidno uma convulsão que é um ponto temporal. O termo “não-provocado” é, no entanto, impreciso porque nunca se pode ter certeza de que não houve fator provocador. Por outro lado, a identificação de um fator provocador não necessariamente contradiz a presença de uma anormalidade epileptogênica. Em indivíduos com uma predisposição duradoura a ter crises epilépticas, uma provocação borderline pode desencadear uma crise, enquanto que em indivíduos não-predispostos, não. Assim, reconhecem-se os limites imprecisos do conceito de crises “provocadas” e “não-provocadas” (FISHER et al., 2014).

Por outro lado, um paciente pode apresentar uma única crise não-provocada após um insulto remoto ao encéfalo como um acidente vascular encefálico (AVE), infecção do sistema nervoso central (SNC) ou trauma cranioencefálico (TCE). Um paciente com tais insultos ao encéfalo tem um risco de uma segunda crise não provocada comparável ao risco de mais crises após 2 crises não-provocadas. Após uma crise não-provocada, o risco de outra crise não-provocada (i.e. risco de recorrência) é de 40-50% em 5 anos conforme um estudo multicêntrico no Reino Unido sobre a evolução precoce de epilepsias e crises epilépticas únicas (estudo MESS). Com 2 crises epilépticas não provocadas não febris, a chance de outra crise em 4 anos é de 75% com um intervalo de confiança (IC) de 95% de 59-87%, aqui retratado como 60-90%. Escolher um determinado limiar de risco pode ser demasiadamente rigoroso e excludente, mas para efeito de comparação, um limiar de 60% excede o risco de recorrência de aproximadamente 50% em 5 anos. Note-se que o risco de recorrência é uma função do tempo, de modo que quanto maior o tempo decorrido desde a última crise, menor é a probabilidade de recorrência (FISHER et al., 2014).

Oquadro 3, item 2, define uma via alternativa para diagnóstico de epilepsia. O seu intento é harmonizar entre circunstâncias para os quais alguns neurologistas e alguns

epileptologistas manejam seus pacientes conforme se considera que a epilepsia está presente após uma única crise não-provocada, devido ao alto risco de recorrência. Tais exemplos incluem pacientes com uma única crise pelo menos um mês após um AVE, ou uma criança com uma única crise associada com uma etiologia estrutural ou sintomática e um estudo de eletroencefalograma epileptiforme. Outro exemplo é um paciente que, após uma única crise não provocada, tem feito o diagnóstico de uma síndrome epiléptica associada com alteração persistente do limiar.

Quadro 3. Definição operacional (prática) de epilepsia

Epilepsia é uma doença do cérebro definida por umas das seguintes condições:
1. Pelo menos duas crise não provocada (ou reflexa) em um intervalo >24h (definição vigente até 2013) 2. Uma crise não provocada (ou reflexa) com probabilidade de recorrência de pelo 3. menos 60% nos próximos 10 anos (equivalente ao risco de recorrência após 2 crises não-provocadas) 4. Diagnóstico de uma síndrome epiléptica
A epilepsia é considerada *"resolvida"* nas seguintes condições:
1. Síndrome epiléptica idade dependente que superaram a idade aplicável 2. Ausência de crises por 10 anos, sendo os últimos 5 sem medicação antiepiléptica

Fonte: Fisher et al., 2014

Uma epilepsia pode apresentar-se inicialmente como *status epilepticus* (*SE*), mas este *per se* não implica epilepsia (FISHER et al., 2014). Os riscos de recorrência não são conhecidos para a maioria dos casos individuais. No entanto, se o clínico pondera que a lesão gerou uma predisposição duradoura a crises não-provocadas com um risco de ecorrência comparável ao de um paciente com duas crises epilépticas não-provocadas, então considera-se a pessoa portadora de epilepsia

A definição revisada não incumbe o clínico de especificar o risco de recorrência em uma circunstância particular. Na ausência de informação clara sobre o risco de recorrência, ou mesmo da disponibilidade de tal informação, a definição *default* de epilepsia surge à segunda crise não-provocada. Por outro lado, se a informação disponível indica um risco de uma segunda crise que excede o 60% a partir do qual se considera epilepsia, então aplica-se a nova definição e a epilepsia pode ser considerada.

1.1.4.4.1 "Epilepsia resolvida": um novo conceito

Um indivíduo que tem estado livre de crises de ausência infantis ou um indivíduo com epilepsia de lobo temporal mesial (ELT) que tem estado livre crises por 10 anos após a

ressecção de sua esclerose hipocampal, ambos sem medicação, devem ser considerados portadores de epilepsia? A ausência de crises epilépticas por longos intervalos de tempo pode resultar de uma das muitas circunstâncias e tratamentos subjacentes. Uma tendência anormal a ter crises não-provocadas pode persistir embora as crises em si estejam controladas pela terapia. Com efeito, crianças podem superar epilepsias, como a epilepsia benigna com espículas centro-temporais (*benign epilepsy with centro-temporal spikes* - BECTS) e algumas pessoas podem ficar permanentemente livres de crises após tratamento como uma amigdalocorticohipocampectomia ou exérese de um foco cortical, por exemplo (FISHER et al., 2014).

A Força-Tarefa buscou uma definição que pudesse abranger tais casos. A literatura médica usa o termo "remissão" implicando a suspensão de sinais e sintomas de uma doença, mas o termo não é bem entendido pelo público, e remissão não implica ausência da doença ou sua cura. O termo cura significa um risco de futuras convulsões não maior que a linha de base da população sã, entretanto após o histórico pessoal de epilepsia, tal nível de risco nunca é atingido. E o termo também não significa que as crises não voltarão. Assim, a força-tarefa adotou o termo *"epilepsia resolvida"*.

O risco de recorrência depende do tipo de epilepsia, idade, síndrome, etilogia, tratamento e muitos outros fatores. Por exemplo a epilepsia mioclônica juvenil (EMJ) é conhecida por um elevado risco de convulsões por várias décadas. Lesões cerebrais estruturais, como malformações do desenvolvimento cortical podem elevar o risco de crises epilépticas a longo prazo. Crises podem recorrer em intervalos variáveis após remissão por ressecção de um foco epileptogênico, como uma malformação cavernosa. Por exemplo, um estudo de 347 crianças chegando a pelo menos 5 anos de "remissão completa" sem uso de fármacos antiepilépticos identificou recaídas tardias em 6% das crianças, uma delas recaindo 8 anos depois da primeira crise. Não estão disponíveis dados dos que recorreram após 10 anos livres de crises, mas o número deve ser <6% (BERG, TESTA, LEVY, 2011). Após a cirurgia do lobo temporal, 54,2% dois pacientes recaem em 6 meses e 1,9% recaem 4 anos após a cirurgia, sendo que destes apenas 0,6% recaem no último ano de seguimento (GOELLNER et al., 2013).

O risco de recorrência após crises não-provocadas decai em função do tempo, embora o risco possa nunca atingir o mesmo nível de indivíduos que nunca tiveram uma crise epiléptica. A maioria das recaídas é precoce. Após uma crise não-provocada, 80-90% dos quais tiveram uma segunda crise, recorrem em 2 anos. Em um estudo, após uma crise não-provocada, crises ocorrem em 4 anos, mas não nos seguintes 3 anos, sugerindo que o risco pode ser baixo, embora

não nulo. O National General Practice Study of Epilepsy no Reino Unido identificou um risco de recorrência de 44% 3 anos após um período de 6 meses livre de crises, 32% após 12 meses e 17% após 18 meses. Não existem dados adequados sobre o risco de recorrência após estar-se livre de crises sem medicações por períodos extensos de tempo. Recaídas tardias são raras após 5 anos. Cerca de 10 anos sem medicamentos antiepilépticos, o risco de recorrência anual é provavelmente muito baixo (FISHER et al., 2014).

Em todo caso, os clínicos terão de individualizar a determinação de se a epilepsia está ou não *"resolvida"* para cada indivíduo que permanece livre de crises por 10 anos, sem antiepilépticos pelos últimos 5 anos (FISHER, 2014; MATHERN, BENINSIG, NEHLIG, 2014).

1.1.4.4.2 Consequências da nova definição operacional

O diagnóstico de epilepsia após uma única crise não provocada quando há alto risco de recorrência pode ou não levar à decisão de iniciar o tratamento. No entanto, a decisão de tratar se distingue do diagnóstico e deve ser individualizada dependendo dos desejos do paciente, da razão risco/benefício individual e das opções disponíveis. O clínico deve ponderar a possibilidade de evitar uma segunda crise com os riscos inerentes aos efeitos adversos dos medicamentos e seu custo para os pacientes. Para aclarar, o diagnóstico de epilepsia e a decisão de tratar são questões relacionadas, mas distintas. Muitos epileptologistas tratam por um certo tempo após uma crise aguda sintomática (e.g.: por encefalite herpética), o que não implica epilepsia. Em contraste, pacientes com crises leves, ou a intervalos muito longos podem não ser tratados mesmo quando o diagnóstico de epilepsia não está em questão (FISHER et al., 2014; PERUCCA, 2014; MATHERN, BENINSIG, NEHLIG, 2014).

Do ponto de vista do paciente, a epilepsia é associada com estigma social e repercussões psicológicas, sociais, cognitivas e econômicas importantes que foram agregadas à definição operacional de epilepsia. A nova definição pode melhorar desfechos ao sensibilizar os clínicos para a necessidade de dar maior consideração ao risco de recorrência após uma crise não-provocada única e dá mais conforto aos clínicos para iniciarem o tratamento antiepiléptico em tais casos. Uma definição prática permitindo diagnóstico precoce será especialmente útil para a prevenção de riscos de lesão física ou consequências sociais desnecessárias resultantes de crises recorrentes em pacientes considerados com alto risco de recorrência. A definição revisada também provê uma oportunidade expandida para intervenções modificadoras de doença que

podem prevenir a progressão da epilepsia e o início de comorbidades (FISHER et al., 2014; HAUSER, 2014).

O diagnóstico correto de epilepsia em pessoas que não tem este diagnóstico feito previamente pode ter consequências negativas e positivas. Consequências econômicas podem incluir o reembolso do custo das medicações por um serviço de saúde pública que, de outro modo, seriam custeados pelo paciente. Por outro lado, muitas pessoas com epilepsia podem ter tem dificuldade de obter autossuficiência pessoal e financeira. O estigma pode afetar algumas pessoas que anteriormente não eram consideradas portadoras de epilepsia, com consequências tais como a perda da acessibilidade a educação ou trabalho e restrição quanto a conseguir relação afetiva estável. Permitir que a epilepsia possa ser declarada "resolvida" pode aliviar o estigma sobre pessoas que passarem a não mais serem consideradas portadoras de sinais e sintomas de epilepsia. Consequências positivas econômicas e de saúde poderão advir quando diagnósticos mais acurados resultarem em tratamentos preventivos e modificadores de doença antes de uma segunda crise (PERUCCA, 2014); (informação verbal)[3].

Pessoas com epilepsias reflexas eram desfavorecidos pela exigência de que a crise epiléptica não é não-provocada; e a inclusão das epilepsias reflexas na definição operacional traz estes indivíduos ao grupo dos portadores de epilepsia (FISHER et al., 2014; HAUSER, 2014).

A definição operacional revisada foi concebida para diagnóstico clínico, e pode não ser apropriada para todos os estudos de pesquisa. Diversas definições operacionais serão usadas dependendo de propósitos específicos e comparações podem ainda ser feitas usando a antiga definição de "duas crises epilépticas não-provocadas". Os investigadores deverão explicitar qual definição usaram em qualquer estudo ou publicação (FISHER, 2014; FISHER et al., 2014; MATHERN, BENINSIG, NEHLIG, 2014).

Uma definição revisada tem implicações para a legislação e para a economia dos sistemas de saúde. Regulações afetando atividades da vida individual, como restrições ao direito de conduzir veículos automotores relacionam-se mais à frequência das crises ou ao seu risco de recorrência que ao diagnóstico de epilepsia em si. Em alguns países o diagnóstico de epilepsia em si limita o período de validade de uma permissão para conduzir ou o tipo de permissão que pode ser obtida. As diretrizes sobre a participação em certos esportes devem estipular restrições para pessoas com diagnóstico de epilepsia, independentemente do histórico de crises.

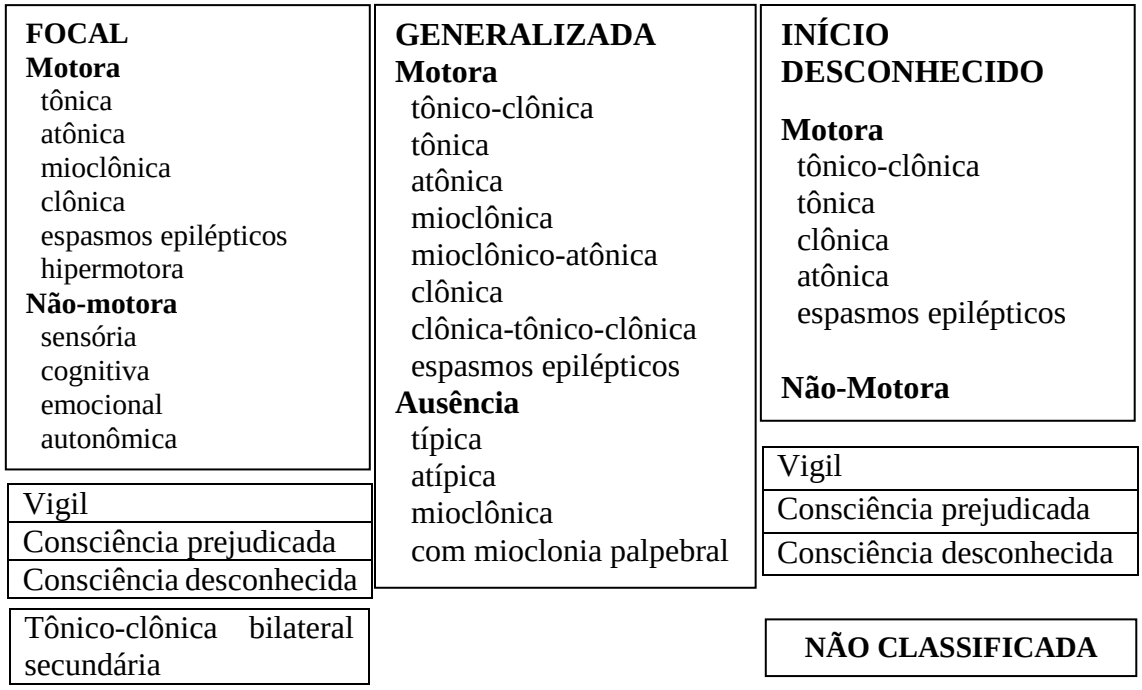
[3] Informação verbal: palestra de Alicia Bogacz, M.D., na 9th Latin-American Summer School on Epilepsy, São Paulo, 22/02/2015.

Benefícios sociais e ajuda financeira podem também ser afetados pelo rótulo diagnóstico. Para a extensão em que uma definição revisada pode afetar o número de pessoas com epilepsia, deve haver repercussões para o indivíduo e para a sociedade. Custos sociais não necessariamente serão altos, entretanto, particularmente se o novo diagnóstico operacional codifica a atual abordagem dos epileptologistas e leva a um manejo melhorado de indivíduos que são mais prováveis ou menos prováveis de ter futuras crises (FISHER et al., 2014; HAUSER, 2014).

1.1.4.5 Classificação Operacional de Crises: em fase de elaboração

Encontra-se em discusão pela Comissão de Nomenclatura e Classificação da ILAE o manuscrito da Classificação de Crises de 2016 (Quadro 4), primeira revisão da Classificação de Crises desde 2010. Entre as principais modificações introduzidas estão: 1) substituição dos termos "simples" e "complexa" qualificativos das crises focais pelos termos indicadores de grau de prejuízo da consciência "vigil - consciência prejudicada - consciência ignorada"; 2) substituição do termo "tônico-clônica secundariamente generalizada" por "tônico-clônica bilateral" 3) reconhecimento de que as crises generalizadas não necessariamente são bilateralmente simétricas 4) inclusão da categoria "não classificada em outra parte"; 5) reconhecimento dos novos tipos de crises. Foram mantidas inovações introduzidas pela Classificação de 2010 como a substituição dos termos "parcial" por "focal" e a criação da categoria "ignorada" em alternativa a "focal" e "generalizada". Uma sessão no site da ILAE (http://www.ilae.org/Visitors/Centre/Class-Seizure.cfm) esteve aberta a comentários públicos por 2 meses até o dia 04/06/2016. O Documento em sua forma definitiva deverá ser publicado nos próximos meses, sem detrimento de sua revisão contínua nos anos seguintes na medida em que se agreguem novos dados de investigação clínica e básica.

Quadro 4: Representação sumária da Classificação Operacional de Crises Epilépticas proposta pela International League Against Epilepsy



Fonte: em fase de elaboração[4]

1.1.4.6 Resolução sobre epilepsia da 68ª Assembleia Geral da Organização Mundial de Saúde: da campanha mundial de 1997 ao pacto de 2015

Em 26 de maio de 2015, na 68ª assembleia geral da Organização Mundial da Saúde (OMS), foi aprovada por unimidade a Resulução intitulada "O ônus global da epilepsia e a necessidade de ação coordenada a nível nacional para solucionar suas consequências sanitárias, sociais e públicas" que recomenda aos Estados membros da OMS a implantação de ações coordenadas contra a epilepsia como parte integrante das políticas nacionais de saúde. Esta Resolução é uma consequência histórica da campanha mundial "Tirando e epilepsia das sombras" lançada pela OMS em parceria com a ILAE e o IBE (International Bureau of Epilepsy) em 1997. A Resolução vem a "catalizar" a união de esforços com outras sociedades profissionais, como a WFN (World Federation of Neurology) pela meta comum de ações concretas contra a doença (COVANIS et al., 2015). Vale ressaltar que o Brasil, através de sua representação na Assembleia da OMS, foi signatário da citada resolução. Assim, espera-se que no futuro próximo venham a ser implantadas estratégias de enfrentamento da epilepsia nos três

[4] Em fase de elaboração: Classificação Operacional de Crises Epilépticas pela Comissão de Nomenclatura e Classificação da ILAE, a ser publicada no periódico **Epilepsia**

níveis do sistema público de saúde no País tal como já ocorreu anteriormente com os programas de hipertensão, diabetes, tuberculose e hanseníase.

As recomendações feitas aso Estados membros (COVANIS et al., 2015) são:

1) reforçar lideranças e governanças efetivas por políticas de saúde geral, saúde mental e de doenças não transmissíveis que incluam a consideração das necessidades das pessoas com epilepsia e disponibilizem os recursos financeiros e humanos identificados conforme necessário para implantar planos e ações baseados em evidências;

2) introduzir e implantar, quando necessário e em acordo com as normas de direitos humanos internacionais nacionais, planos de saúde nacionais de ação para o manejo da epilepsia objetivando a superação das iniquidades e desigualdades socias, sanitárias e em outros serviços relacionados, com atenção especial a pessoas com epilepsia vivendo em condições de vulnerabilidade tais como aquelas que habitam áreas remotas ou pobres, incluindo o reforço dos serviços de saúde públicos e o treinamento de recursos humanos com técnicas apropriadas;

3) integrar o manejo da epilepsia, incluido os cuidados de saúde e sociais, particularmente em serviços baseados na comunidade, no contexto da cobertura universal de saúde incluindo reabilitação baseada em comunidade, cuidados primários em saúde, quando apropriado, no intento de reduzir o retardo de tratamento da epilepsia pelo treinamento de cuidadores não especializados para fornecer a estes conhecimentos básicos sobre o manejo da epilepsia tais como as modalidades de diagnóstico, tratamento e seguimento tanto quanto possível praticáveis nos estabelecimentos de atenção primária, bem como pelo empoderamento das pessoas com epilepsia e de seus cuidadores para o maior uso de programas de autocuidado e de cuidados domiciliares e pelo asseguramento de um sistema de referenciamento forte e funcionante e pelo reforço dos sistemas de informação e de vigilância em saúde para a coleta, registro, análise e avaliação rotineiras das tendências do manejo da epilepsia;

4) Financiar o estabelecimento e a implantação de estratégias de manejo da epilepsia, particularmente aumentar o acesso a e promover a viabilidade financeira de medicamentos antiepilépticos seguros, efetivos e de qualidade assegurada e incluir antiepilépticos essenciais nas listas de medicamentos essenciais;

5) assegurar a conscientização e a educação sobre epilepsia em particular nas escolas primárias e secundárias no intento de ajudar a reduzir os falsos conceitos, a estigmatização e discriminação acerca das pessoas com epilepsia e suas famílias;

6) promover ações de prevenção das causas evitáveis de epilepsia usando intervenções baseadas em evidência dentro do setor de saúde e em outros setores;

7) aumentar investimentos na pesquisa da epilepsia;
8) engajar a sociedade civil e outros parceiros nas ações referidas nos itens 1-7.

1.2 Modelagem de crises epilépticas *in vivo* para estudo da ictogênese na pesquisa e desenvolvimento de fármacos com atividade antiepiléptica

Até a observação de Merrit e Putnam (1938) de que a inibição da extensão máxima dos membros posteriores do rato no modelo do eletrochoque máximo (ECM) tem alto valor preditivo para eficácia clínica contra crises generalizadas tônico-clônicas, os únicos fármacos antiepilépticos eficazes eram os barbituratos, completamente ineficazes em outros tipos de crise como as de ausência (os barbituratos, como as benzodiazepinas, inclusive aumentam a frequência e duração deste tipo de crise); com efeito aqueles pesquisadores descobriram a atividade antiepiléptica da fenitoína, um análogo dos barbituratos com baixa potência sedativa, desmistificando a noção dogmática, então vigente, de que a efetividade anticonvulsivante era diretamente proporcional à potência sedativa e inaugurando, assim, uma era de menos empirismo no desenvolvimento de FAE (MCNAMARA, 2012).

Apesar do desenvolvimento exitoso de vários novos fármacos antiepilépticos (FAE) nas últimas duas décadas (*e.g.*: levetiracetam, brevetiracetam, eslicarbazepina, topiramato, pregabalina, gabapentina, tiagabina, vigabatrina, retigabina, perampanel, lamotrigina, lacosamida), a pesquisa de novas terapias com melhores eficácia e tolerabilidade persiste como meta importante (LÖSCHER, 2011). As investigações em modelos animais de crise epiléptica e epilepsias tem sido insubstituíveis para estabelecer a eficácia e a segurança de novos compostos anticonvulsivantes antes que sejam testados em pacientes (investigação pré-clínica) (WHITE et al., 2006; LÖSCHER, 2011).

Na descoberta de FAE, os modelos animais podem ter vários propósitos (Quadro 5):

Quadro 5: Papeis dos modelos animais no desenvolvimento de fármacos antiepilépticos

Descoberta de novos FAE
Caracterização do espectro de atividade antiepiléptica de novos FAE
Modelos de crises epilépticas farmacoresistentes
Averiguar se a eficácia varia no tratamento crônico
Comparação de efeitos adversos de novos FAE em animais com e sem epilepsia
Estimação da faixa concentração plasmática terapêutica para os primeiros testes pré-clínicos
Descoberta de estratégias modificadoras de doença (antiepileptogênese)

Fonte: Löscher, 2011

Nem todos os modelos de crise epiléptica ou de epilepsia se prestam aos os propósitos acima. Ademais, a intenção do experimento é essencial para a seleção do modelo animal

adequado. Por exemplo, o modelo de crises epilépticas por eletrochoque máximo (ECM) permite a testagem de grandes números de compostos diversos em um espaço de tempo curto e com um custo relativamente baixo, sendo mais adequado para este fim do que modelos de epilepsia (*e.g.:* pós-*status epilepticus* por pilocarpina, por Li^{+}-pilocarpina, por ácido caínico e por abrasamentos químico e elétrico ou ainda modelos genéticos).

A absoluta maioria dos modelos usados em pesquisa são muito mais modelos de crises epilépticas do que modelos de epilepsia propriamente dita. Dado que a epilepsia é caracterizada por uma predisposição a crises epilépticas espontâneas e recorrentes, um teste em que a crise epiléptica é gerada por uma descarga elétrica ou por um quimioconvulsivante em um animal não epiléptico não pode, portanto, ser representativa de epilepsia. Por outro lado, há modelos de epilepsia genéticos em animais de linhagem endogâmica selecionada para fenótipos epilépticos (*e.g.:* KM, WAR, GEPR-9, GEPR-3, GAERS, DBA/2, GASH:Sal) ou em animais transgênicos, *knockouts* ou mutantes (*e.g.:* camundongo *myk*) que claramente aproximam-se mais das epilepsias humanas que modelos com epileptogênese induzida por manipulação farmacológica, como os modelos de epilepsia pós-*status epilepticus* da pilocarpina e do ácido caínico. **Infelizmente os pesquisadores frequentemente não estão advertidos das diferenças entre modelos de crise epiléptica e modelos de epilepsia, embora esta distinção seja importante na interpretação de dados obtidos em tais modelos** (LÖSCHER, 2011).

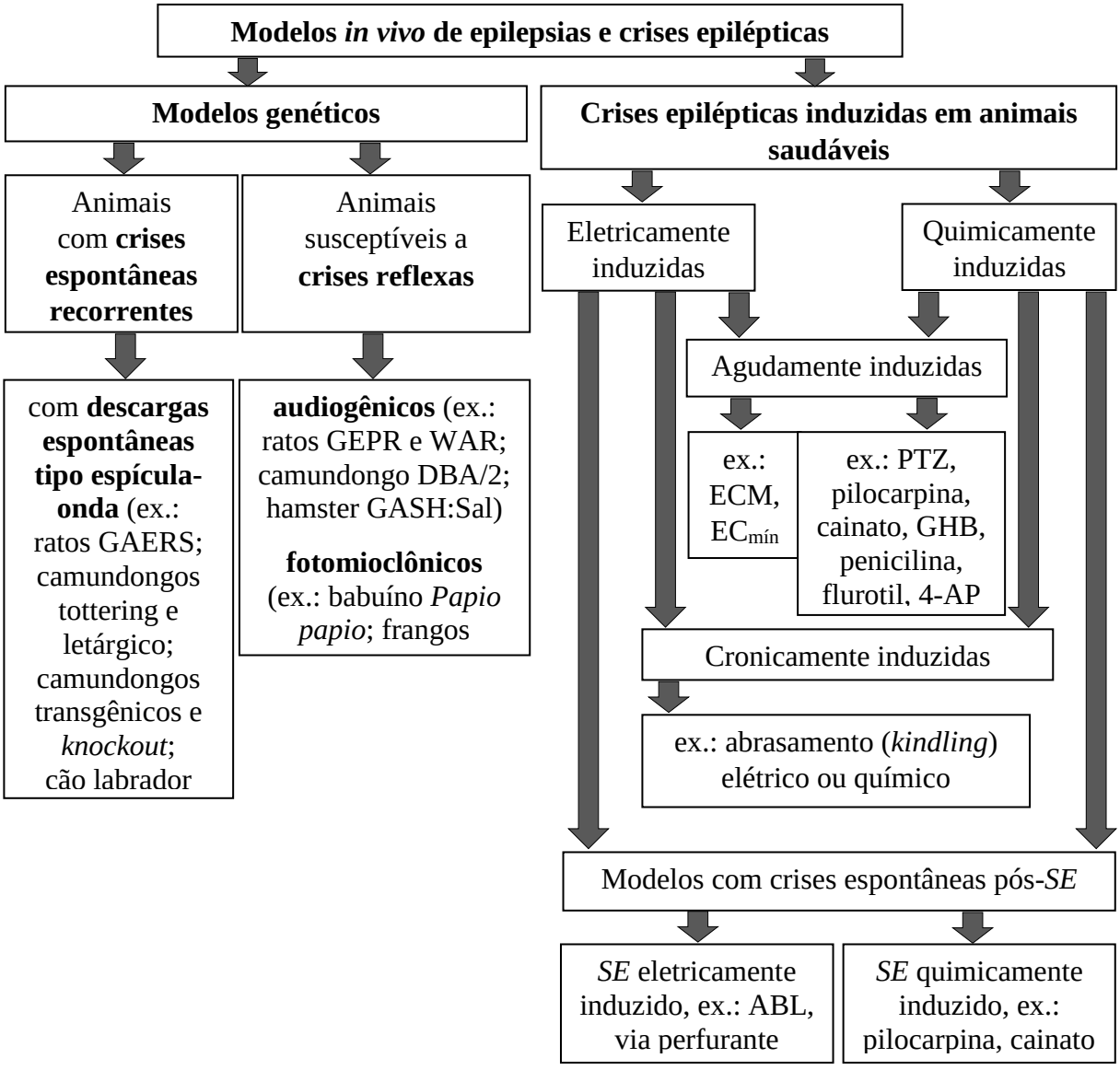
Por exemplo, quando se usa a pilocarpina (ou ácido caínico) como quimioconvulsivante agudamente, tem-se um quimioconvulsivante como outro qualquer (como PTZ, bicuculina, picrotoxina, alcalóides ou metilxantinas) no senso de que se trata tão somente de um modelo de crise convulsiva generalizada (de origem focal, com consciência prejudicada, secundariamente generalizada, no caso da pilocarpina e do cainato) ou modelo de *SE,* e dever-se-ia referí-la como tal, e não como modelo de ELT. Do contrário, ao relacionar pilocarpina com ELT, necessariamente dever-se-ia referir às crises espontâneas recorrentes que acometem os animais (cronicamente, após o período "silencioso", sem crises, que dura em média 15 dias, variando de 4 a 44 dias) (informação verbal)[5] após a cessão do *SE* induzido pelo quimioconvulsivante.

Diversos modelos de epilepsias e de crises epilépticas tem sido descritos e podem enquadrar-se em diversas categorias ex.: modelos com crises espontâneas *versus* modelos com crises induzidas eletricamente ou quimicamente, modelos de crises recorrentes *versus* crises únicas (crônicos *versus* agudos), modelos com crises parciais *versus* crises generalizadas,

[5] Informação verbal: Fúlvio Alexandre Scorza, M.Sc., Ph.D., na 9th Latin American Summer School on Epilepsy, São Paulo, 01/03/2015

modelos com crises convulsivas *versus* crises não-convulsivas, modelos de crises autolimitadas *versus status epilepticus*, modelos para *screening* (testagem) de moléculas com atividade antiepiléptica *versus* modelos para testagem mais avançada de eficácia contra tipos específicos de crise, modelos relacionados a mecanismo conhecido *versus* modelos sem mecanismo específico ou conhecido, modelos de estímulo limiar *versus* estímulo supra-limiar (Figura 1).

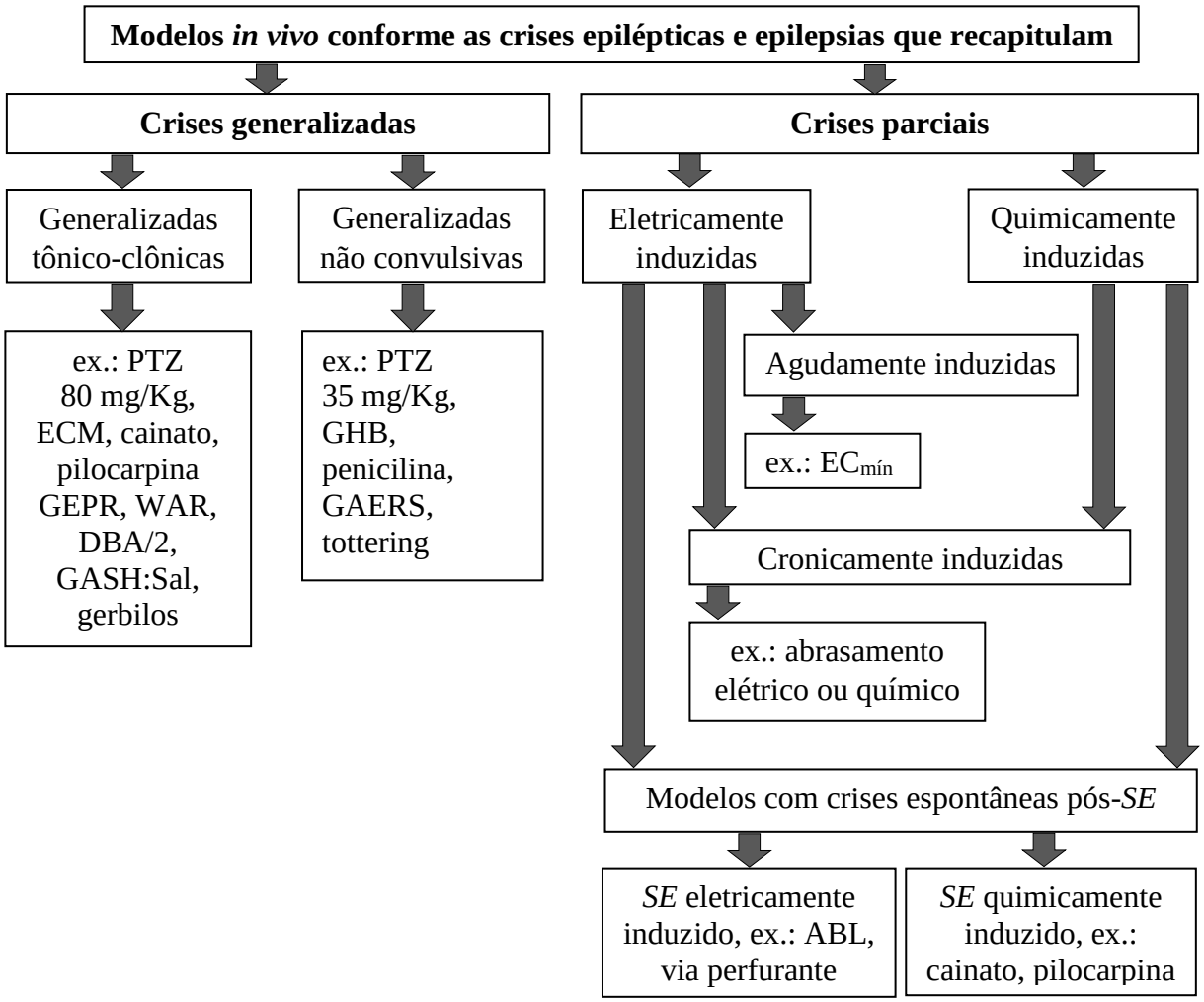
Figura 1 – Sinopse de modelos *in vivo* de crises epilépticas e epilepsias



Genetic absence epilepsy rat from Strasbourg (GAERS); genetically epilepsy-prone rat (GEPR); Wistar audiogenic rat (WAR); diluted brown non-agouti 2 (DBA/2); genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca (GASH:Sal); eletrochoque máximo (ECM); eletrochoque mínimo de 6-Hz ($EC_{mín}$); pentilenotetrazol (PTZ); gama-hidroxi butirato (GHB); 4-aminopiridina (4-AP); *status epilepticus* (*SE*); amígdala basolateral (ABL)
Fonte: Modificado de Löscher, 2011

Tendo em vista que o valor preditivo dos modelos baseia em grande parte a pesquisa pré-clínica e que a efetividade para tipos específicos de crise epiléptica ou de epilepsia norteia a escolha clínica de um FAE, os modelos *in vivo* são sumarizados conforme seu valor preditivo na Figura 2.

Figura 2 - Modelos *in vivo* de crises epilépticas e epilepsias conforme as síndromes clínicas que recapitulam.



Pentilenotetrazol (PTZ); eletrochoque máximo (ECM); genetically epilepsy-prone rat (GEPR); Wistar audiogenic rat (WAR); camundongo diluted brown non-agouti 2 (DBA/2); genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca (GASH:Sal); gama-hidroxi butirato (GHB); genetic absence epilepsy rat from Strasbourg (GAERS); eletrochoque mínimo de 6-Hz ($EC_{mín}$); *status epilepticus* (*SE*); amígdala basolateral (ABL)
Fonte: Modificado de Löscher, 2011

No âmbito do rastreamento em massa de moléculas com atividade antiepiléptica verifica-se uma crescente retomada de interesse pelo uso de sistemas biológicos evolutivamente menos complexos no intuito ético de evitar manipulações desconfortáveis e supérfluas em modelos mamíferos reservando-os para estudos de caracterização complementar *a posteriori* (RAMAKRISHNAN et al., 2013; CUNLIFFE et al., 2015). Isto foi prenunciado por

pesquisadores como Guido Palladini *c.* 1960, embora merecendo pouca repercussão àquela época. Tal tendência cria a necessidade de validação de alvos farmacológicos e de equivalentes epilépticos em sistemas biológicos simples como cultivos celulares, sarcodíneos de vida livre, platelmintos e cnidários.

Para a descoberta de fármacos com atividade antiepiléptica, que depende da testagem de grandes números de compostos distintos, os modelos devem ser fáceis de executar, e ainda tempo- e custo-efetivos, além de ter valor preditivo de atividade clínica. Isso explica porque ECM e o pentilenotetrazol (PTZ) desenvolvidos há cerca de 70 anos permanecem como os modelos animais de crise epiléptica mais usados no desenvolvimento de FAE (LÖSCHER, 2011).

No ECM, as convulsões tônico-clônicas são induzidas por aplicação transcorneal ou, menos frequentemente, transauricular de um estímulo elétrico de curta duração (0,2 segundos) supralimiar (50 mA em camundongos ou 150 mA em ratos). Neste modelo, o endpoint convulsivo é a extensão tônica dos membros posteriores do animal (LÖSCHER, 2011), isto é, estadio 8 na escala Jobe (crise tônico-clônica máxima expressa por perda do reflexo de endireitamento, flexão do segmento cefálico sobre o tronco, tono anterior do tronco (prostótono) e extensão máxima dos quatro membros) (Tabela 13). A inibição deste fenômeno por um dado fármaco é altamente preditiva da efetividade do mesmo em inibir crises tônico-clônicas em humanos (VELÍSEK, 2006; MCNAMARA, 2012). Ademais, foi alegada a validade preditiva deste modelo para crises focais. No entanto a falta de efetividade anti-ECM de vários novos FAE (levetiracetam, tiagabina, vigabatrina) os quais tem comprovada efetividade clínica em crises focais contraria de maneira contundente esta alegação. Assim, modelos de crise focal devem ser incluídos em estágios secundários de triagem pré-clínica de FAE.

No PTZ subcutâneo, a dose de PTZ capaz de induzir uma crise clônica de pelo menos 5 segundos em 97% dos animais (DE_{97}) é injetada subcutaneamente e o aparecimento de convulsões é usualmente observado dentro de um período de 30 minutos. Pensa-se que este teste tem valor preditivo para crises tipo ausência e tipo mioclônico. No entanto, vários FAE com atividade contra estes tipos de crise na clínica foram inefetivos no modelo do PTZ. Assim, necessitam-se modelos de crises mioclônicas e de ausência, incluindo cepas mutantes com crises espontâneas, para uma correta predição da eficácia de candidatos a FAE contra estes tipos de crise (LÖSCHER, 2011).

Inquestionavelmente testar substâncias nestes modelos resultou na identificação de muitos compostos efetivos contra epilepsias e crises epilépticas. No entanto, esta abordagem tem sido menos útil na descoberta de drogas para tratar outros certos tipos de crise, particularmente as focais, mioclônicas e atônicas. Isto se relaciona com o fato de estes dois modelos terem como substratos moleculares principais os canais de sódio e de cálcio operados por voltagem e canais de cloreto operados por ligante, resultando na seleção de moléculas que tem tais substratos por alvo farmacológico e que possuem características químicas inevitavelmente similares àquelas dos antiepilépticos clássicos também triados pelos mesmos ensaios. Com efeito, as epilepsias associadas com crises de tipo focal ou atônico são frequentemente refratárias. É provável que muitos compostos que podem ser excelentes para prevenir eventos ictais focais e atônicos tenham sido descartados por não exibirem eficácia nestes modelos corriqueiros de crise tônico-clônica e de ausência (ENGEL JR; SCHWARTZKROIN, 2006; SCHWARTZKROIN; ENGEL, 2006).

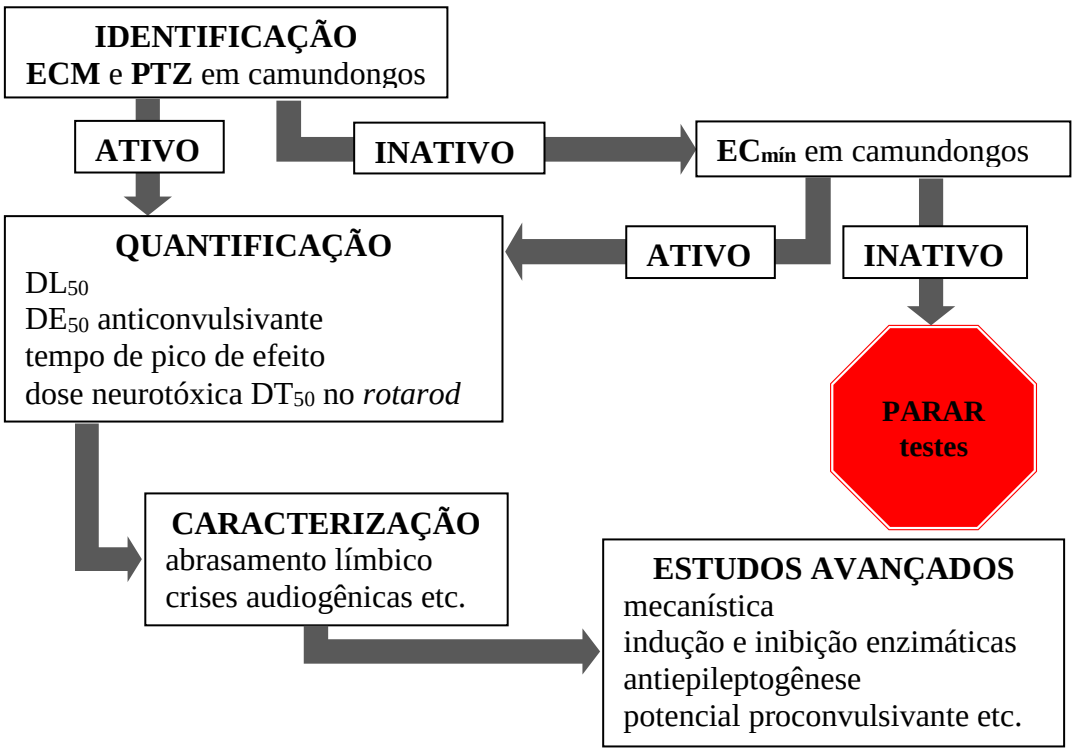
A despeito do desenvolvimento de vários novos FAE nos últimos 20 anos, a evidência atual indica que a eficácia do tratamento farmacológico das epilepsias não foi afetada por tais descobertas e o pobre controle das crises continua a acometer expressivos 30-40% das pessoas com epilepsia. Assim, há a necessidade de incorporar modelos de epilepsias e crises epilépticas refratárias às estratégias de desenvolvimento de FAEs. Esta ideia não é nova, no entanto tem sido negligenciada durante décadas (BAULAC; PITKÄNEN, 2009).

Baseado na definição de farmacoresistência em pacientes com epilepsia, o termo pode ser aplicado no contexto de modelos animais como “atividade de crise persistente irresponsiva ou pobremente responsiva à monoterapia com pelo menos dois FAE em dose máxima tolerada”. Nos últimos 20 anos tem sido desenvolvidos vários modelos que preenchem este requisito.

Um exemplo de modelo de convulsões resistentes a FAE são as convulsões psicomotoras em camundongos (eletrochoque mínimo - $EC_{mín}$). Neste modelo, uma estimulação por pulso elétrico retangular de baixa frequência (usualmente 6 Hz) e curta duração (0,2 milissegundos) administrada durante 3 segundos por eletrodos corneais induz convulsões que são reminiscentes das convulsões psicomotoras da epilepsia límbica humana. Na dose de corrente efetiva em suscitar convulsões em 97% dos animais (DE_{97}) de 22 mA para camundongos, todos os antiepilépticos bloqueiam a crise, de modo que esta dose não é discriminativa de classe clínica. Entretanto quando se usam 44 mA, praticamente todos os FAEs perdem seu efeito, com exceção do levetiracetam em alta dose, do valproato, e de anguns fármacos de 2ª geração como a retigabina e o brivaracetam. Baseado nestas observações, foi

sugerido que o $EC_{mín}$ pode ser útil como modelo custo-efetivo de crises límbicas resistentes a farmacoterapia. Este modelo está incluso no fluxograma de triagem e desenvolvimento de FAEs do NIH/NINDS (Figura 3) que é levado a cabo pela Universidade de Utah (LÖSCHER, 2011; MCNAMARA, 2012).

Figura 3 – Árvore de decisão para testagem de atividade antiepiléptica aplicada no projeto de desenvolvimento de antiepilépticos do National Institutes of Health – EUA



Eletorchoque máximo (ECM); pentilenotetrazol (PTZ); eletrochoque mínimo de 6 Hz ($EC_{mín}$); dose letal 50% (DL_{50}); dose efetiva 50% (DE_{50}); dose tóxica 50% (DT_{50}).
Fonte: Adaptado de Löscher, 2011

Assim, há grande necessidade de desenvolver novos modelos animais de tipos de convulsão particularmente refratários às farmacoterapias atuais que possam ser custo-efetivos para rastreio de substâncias com potencial antiepiléptico. O desenvolvimento de modelos baseado em marcadores substitutivos ou equivalentes de crise epiléptica deverá suprir este papel.

Uma vez estabelecida a eficácia de um FAE investigacional usando modelos de testagem simples como o ECM e o PTZ, uma bateria de testes adicionais deve ser feita *a posteriori* para melhor caracterizar a atividade antiepiléptica e o espectro de ação do composto. O modelo mais usado com esta finalidade é o modelo de **abrasamento elétrico límbico** (amígdala ou hipocampo) da ELT. Enquanto os modelos de ECM e PTZ induzem crises em

animais sadios, o abrasamento é um modelo em que a aplicação de estímulo elétrico via eletrodos profundos em estruturas límbicas induz uma susceptibilidade permanentemente alta a crises epilépticas convulsivas além de outras alterações neuroplásticas similares àquelas que ocorrem na ELT em humanos. **Este modelo é o único atualmente conhecido capaz de predizer adequadamente a efetividade clínica contra crises parciais em pacientes** e é o único modelo crônico atualmente em uso na maioria dos grandes programas de descoberta de FAEs, inclusive aquele do NIH/NINDS (Figura 3). As tentativas de substituir este dispendioso e laborioso modelo por outros tais como abrasamento por via corneal não tiveram sucesso porque o valor preditor destes últimos não foi claro (LÖSCHER, 2011).

É importante sublinhar que os tratamentos farmacológicos atualmente em uso clínico representam terapias capazes apenas de prevenir as crises (ou seja, anti-ictogênicas) mas não são terapias modificadoras de doença (isto é, não são capazes de prevenir a progressão de alterações neuroplásticas epileptogênicas). Ultimamente a atenção da comunidade científica se tem voltado para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas com finalidade explicitamente antiepileptogênica. A maior parte dos estudos pré-clínicos neste sentido testa combinações de fármacos antiepilépticos e neuroprotetores com múltiplos mecanismos distintos que, administradas após um insulto inicial, evitam que este ponha em marcha durante um período silente (isto é, um período sem crises) o remodelamento pró-excitatório de redes neurais o qual produz o persistente rebaixamento patológico do limiar de crise que caracteriza as epilepsias. A translação clínica de tais estratégias no entanto tem resultado desapontadora até o momento (BRANDT et al., 2015; KLEE et al., 2015; LÖSCHER, 2015; LÖSCHER, HIRSCH, SCHMIDT, 2015).

Na esteira da recente reavaliação das síndromes epilépticas, um novo conceito de encefalopatia epiléptica foi introduzido. Ele se refere a síndromes epilépticas em que características comportamentais e epilépticas são atribuídas a iterados eventos ictais mais que a uma etiologia subjacente. Uma variedade de tais síndromes é agora reconhecida, incluindo a síndrome de Landau-Kleffner, a epilepsia com complexos espícula-onda contínuos durante o sono de ondas lentas, a encefalopatia mioclônica precoce, a síndrome de Ohtahara, a síndrome de Dravet, a síndrome de West, a síndorme de Lennox-Gastaut, o *status* mioclônico nas encefalopatias não-progressivas e talvez até a ELT com esclerose temporal mesial. Para estas síndromes, as convulsões parecem causar deterioração progressiva, sugerindo que uma intervenção terapêutica precoce e efetiva pode prevenir incapacidades severas a longo prazo. Também aqui os modelos animais serão essencias para o esforço de elucidar os mecanismos

que causam a progressão nos vários tipos de encefalopatias pilépticas, para desenhar técnicas diagnósticas que irão determinar quando intervir e desenvolver intervenções terapêuticas mais efetivas (ENGEL, 2006; ENGEL JR, SCHWARTZKROIN, 2006; SCHWARTZKROIN, ENGEL, 2006).

Quando a classificação de 1981 foi aceita havia informação insuficiente para embasá-la em critérios mecanísticos e anatômicos; e permanece ainda a questão sobre se o conhecimento atual sobre mecanismos básicos das convulsões é suficiente para permitir uma classificação mais "diagnóstica". **Numa tentativa de eliminar os vieses de uma classificação baseada puramente em fenômenos clínicos e eletroencefalográficos, as duas últimas classificações de crises da ILAE tiveram entre suas prioridades identificar eventos ictais que representassem mecanismos fisiopatológicos e substratos anatômicos discretos, que possam ser usados como entidades diagnósticas mais que remeter somente a designações fenomenológicas para propósito descritivo (ENGEL, 2001). Este intento é importante e bem-vindo para a pesquisa animal em áreas onde a fenomenologia humana pode ser difícil de reproduzir, mas os mecanismos fisiopatológicos e substratos anatômicos podem ser efetivamente modelados e verificados.**

Assim, a classificação atual tem em conta critérios como mecanismo fisiopatológico (ex.: eletrofisiologia, redes neurais, e ação de neurotransmissores), substratos anatômicos, resposta a anticonvulsivantes, padrão eletroencefalográfico ictal, padrão de propagação, características pós-ictais e síndromes epilépticas associadas. Estas alterações deverão se fazer acompanhar de ressonâncias na pesquisa básica (ENGEL JR, SCHWARTZKROIN, 2006).

Assim mesmo é discutível se existem – ou se podem ser criados – modelos animais que reproduzam fielmente alguma condição epiléptica humana. **Consequentemente, uma abordagem para modelar a epilepsia humana é definir as partes componentes do distúrbio epiléptico e modelar cada parte individualmente. Mesmo uma única crise (com poucas exceções) consiste de uma evolução de eventos, cada um deles com diferentes mecanismos e substratos anatômicos que podem ser modelados individual e independentemente.** Os fenômenos laboratoriais podem representar partes componentes de um distúrbio epiléptico ou prover informação sobre distúrbios que tem sido referidos como epilepsia-equivalentes; e aguns marcadores substitutivos podem servir de epilepsia-equivalentes.

Os modelos animais de epilepsia também são importantes para pesquisa e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas não farmacológicas (ENGEL JR, SCHWARTZKROIN, 2006) como a estimulação cerebral profunda (DBS – *deep brain*

stimulation), a estimulação magnética transcraniana (TMS – *transcranial magnetic stimulation*) a estimulação vagal (VNS – *vagus nerve stimulation*) e abordagens diagnósticas de imagenologia funcional como a tomografia por emissão de fóton único (SPECT – *single photon emission tomography*), tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT– *positron emission tomography*), ressonância magnética funcional (fMRI) com definição dependente de oxigenação sanguínea (BOLD – *blood oxygenation level-dependent definition*), espectroscopia por ressonância magnética de voxel único ou múltiplo (MRS) e ainda de algoritmos para detecção automática de crise epiléptica por monitorização eletroencefalográfica.

Os modelos animais de epilepsia e crises epilépticas tem ainda sido usados para elucidar mecanismos neuronais da função cerebral normal ou para identificar abordagens que podem diminuir a morbidade associada, incluindo a progressão do processo epileptogênico, distúrbios neuropsiquiátricos interictais (*e.g.*: depressão, déficits de aprendizado e memória na ELT e retardo do desenvolvimento neuropsicomotor em crianças) (ENGEL JR, SCHWARTZKROIN, 2006; EPPS et al., 2013; KLEIN et al., 2015; MULA, SANDER, 2016).

Com provável exceção das crises de ausência típicas, cujo evento ictal é estereotipicamente repetitivo e representa mais provavelmente um mecanismo fisipatológico único, a maioria absoluta dos eventos ictais se caracteriza por um padrão de evolução que reflete uma sequência de distúrbios fisiopatológicos em escala de rede neural e no espaço extracelular que resulta no recrutamento de estruturas adjacentes e distantes.

A depender do tipo de crise epiléptica, as fases ictais de iniciação, propagação, manutenção e terminação podem ser desmembradas e independentemente estudadas usando modelos animais adequados. A *epilepsia partialis continua*, que consiste de crises epilépticas convulsivas focais que perduram por horas ou mesmo anos, fornece uma valiosa indicação de que os mecanismos que podem prevenir a propagação da atividade ictal não necessariamente serão os mesmos envolvidos na terminação das crises. Em adição, os mecanismos de sincronismo – condição definidora da maioria das crises epilépticas – podem ser analisados produzindo potenciais revelações sobre como interferir num processo ictal em evolução. A desincronização representa um processo de ocorrência natural potencialmente envolvido na terminação de atividade ictal que pode estar implicado no mecanismo de medidas terapêuticas como a DBS e a TMS. Ademais, modelos animais de diversos tipos de crise podem determinar por quê alguns tipos de crise param e ourtras podem evoluir como *status epilepticus* (ENGEL JR, SCHWARTZKROIN, 2006).

A pesquisa em crises epilépticas e epilepsias com modelos animais começa com a identificação de perguntas clínicas relevantes – que não possam ser facilmente respondidas na pesquisa clínica, mas podem ser resolvidas com o estudo de sistemas "mais simples" em que as variáveis possam ser mantidas sob controle experiemntal. A escolha do modelo depende de questões de interesse, bem como dos recursos técnicos disponíveis e da expertise do investigador. Há uma vasta gama de sujeitos experimentais (variando de sarcodíneos a primatas), preparações (de ovócitos e culturas a animais intactos) e abordagens técnicas.

Os modelos animais podem ser estudados eletrofisiologicamente *in vivo* agudamente (em que o animal é eutanasiado ao fim do experimento) ou cronicamente (em que o mesmo animal é estudado repetidamente por longos períodos). Investigações eletrofisiológicas *in vitro* podem ser praticadas em tecido normal tornado convulsivo "*in loco*" ou em tecidos removidos de animais em que as convulsões foram induzidas. Preparações *in vitro* podem ser agudas (fatias de cérebro, células dissociadas) ou de longo prazo (culturas). O tecido pode ser usado para eletrofisiologia, tomada de imagens e estudos metabólicos e podem ser fixados para posterior estudo de elementos estruturais. No passado, investigações morfológicas e neuroquímicas requeriam a eutanásia do animal e remoção dos tecidos. No entanto hoje são possíveis avaliações estruturais e funcionais por neuroimagem em modelos crônicos (ENGEL JR, SCHWARTZKROIN, 2006).

Investigações neuroquímicas são usualmente praticadas *in vitro*, mas podem-se fazer técnicas de microdiálise, PET-CT e MRS. Investigações farmacológicas podem ser praticadas em animais acordados, em preparações de tecidos, e *in vivo* em PET-CT e em SPECT. Investigações genéticas podem ser factíveis em modelos animais usando técnicas de microarray; inquéritos de milhares de genes (de células ou tecidos excisados) que podem estar alterados pelo processo convulsivo ou por intervenções terapêuticas, podem ser avaliados e quantificados. A manipulação gênica (knockouts, knockdowns, transgenia) podem ser usados para investigar mecanismos envolvendo genes e seus produtos. Finalmente, os dados derivados de pesquisa básica e clínica podem ser usados para criar modelos *in silico* onde as variáveis estão maximamante controladas. Todas estas abordagens proveem informações que, entretanto, devem ser validadas em condições clínicas (ENGEL JR, SCHWARTZKROIN, 2006).

Assim, quando se desenvolvem modelos, devem-se adotar estratégias que irão ajudar a definir e abordar as questões críticas associadas aos variados fenótipos de crises e síndromes epilépticas que tem sido clinicamente descritos. Talvez a estratégia mais amplamente aceita

(explícita ou implicitamente) tenha sido a de concentrar-se em componentes chave das crises e síndromes.

1.3. Sódio-potássio-adenosina-trifosfatase, E.C. 3.6.1.37 (Na^+,K^+-ATPase, NKA)

A Na^+,K^+-ATPase (NKA) é o mais conspícuo membro da família das ATPases tipo P, que tem como característica principal a presença no seu ciclo reacional de um estado intermediário fosforilado e que inclui, entre outras, a H^+,Ca^{+2}-ATPase do retículo sarcoplasmático do músculo liso (SERCA) e a H^+,K^+-ATPase das células oxínticas do epitélio gástrico. A NKA bombeia 3 Na^+ para o meio extracelular e 2 K^+ para o citoplasma a cada ATP hidrolisado, gerando gradientes eletroquímicos por meio desta estequiometria desigual. Uma vez que os íons K^+ se dissipam através de canais, o potencial de repouso da membrana é ditado principalmente pela condutância plasmalemal deste íon. Diversamente, a bomba SERCA contratransporta H^+, que se dissipam através de canais de membrana. A NKA é primariamente uma bomba de sódio, pois o potássio pode ser substituído por cátions monovalentes, como Li^+, NH_4^+, sódio e mesmo cátions orgânicos, enquanto que apenas Li^+ e H^+ podem substituir o Na^+ parcialmente. A conservação e a restauração dos potenciais de membrana pela NKA são de fundamental importância para a manutenção da excitabilidade neuronal, para a condução do potencial de ação, para regulação do volume celular, do pH e da concentrção de cálcio intracelular; e a diferença de potencial elétrico contida nos gradientes de transmembrana é usada como fonte energética em numerosos processos de transporte ativo secundário de moléculas orgânicas como glicose e captação sináptica de neurotransmissores por exemplo (BENARROCH, 2011; TOYOSHIMA, KANAI, CORNELIUS, 2011).

A NKA é uma proteína expressa de modo virtualmente ubíquo nas células do reino animal (KLIMANOVA et al., 2015), salvo exceções como o eritrócito canino (SONG et al., 2014). A NKA é um heterodímero composto essencialmente de uma subunidade catalítica α de cerca de 1000 resíduos de aminoácidos e de uma subunidade β, com aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos, uma chaperona glicosilada de maneira variável, que é requerida para a liberação da NKA do retículo endoplasmático e sua inserção no plasmalema e para uma atividade enzimática plena (BENARROCH, 2011). Às subunidades α e β pode agregar-se uma subunidade com uma sequência Phe-X-Tyr-Asp (FXYD) característica, denominada subunidade FXYD, com cerca de 70-180 resíduos de aminoácidos, regulatória, expressa de modo tecido-específico. Em humanos existem 4 isoformas de subunidade α codificadas por genes distintos, 3 isoformas de subnidade β e 7 de FXYD, permitindo variantes da composição

subunitária de NKA (TOYOSHIMA et al., 2011). O tráfego de NKA para a membrana plasmática é um processo contínuo durante o qual a subunidade α sofe rearranjos estruturais. As subunidades ligam-se não covalentemente (LIU, XIE, 2010).

O funcionamento da NKA responde por 30% do consumo total de ATP do corpo humano (APERIA, 2007) e por 40-50% do dispêndio total de ATP do cérebro (KIRSHENBAUM et al., 2011). A atividade da Na^+, K^+-ATPase cerebral é o principal responsável pela manutenção dos gradientes eletroquímicos de transmembrana do sódio e do potássio assim como para a captação de solutos orgânicos dependente de sódio. No cérebro, a atividade da Na^+, K^+-ATPase contribui de maneira crucial para a menutenção do potencial de repouso e sua restauração após os potenciais de ação, bem como para a captação e liberação de neurotransmissores. Consequentemente, o decréscimo na atividade da Na^+,K^+-ATPase afeta criticamente a sinalização por neurotransmissores e a atividade neural, bem como o comportamento animal (DELLA-PACE et al., 2013; MARQUEZAN et al., 2013; FUNCK et al., 2014, 2015)

A subunidade α consiste em 3 domínios citoplásmicos, um atuador (A), um ligador de nucleotídeo (N) e um de fosforilação (P) e 10 hélices de transmembrana (M1-M10). Ela contém a região N-terminal de 40 resíduos rica em Lys que é alvo de fosforilação por PKC e serve de plataforma de interação molecular com outras proteínas. Na cabeça ATPásica de NKA, o domínio N é inclinado cerca de 20° em direção ao domínio A, havendo somente uma interação entre ambos: uma ponte eletrostática (ponte de sal) entre Arg^{551} do domínio N e Glu^{223} do domínio A. Pensa-se que Arg^{551} interage com o fosfato β do ATP, induzindo a abertura da cabeça ATPásica, que se crê ser o evento chave na transição para o estado E1. A porção extracelular da subunidade M9 interage com FXYD e M10 associa-se ao domínio transmembrana da subunidade β (OGAWA et al., 2009; SHINODA et al., 2009; TOYOSHIMA, KANAI, CORNELIUS, 2011; KLIMANOVA et al., 2015; OGAWA et al., 2015).

A subunidade β atua como uma chaperona, que ao ligar-se com a subunidade α recém-sintetizada facilita seu envio para e inserção na mambrana e confere-lhe estabilidade conformacional. A subunidade β também modula propriedades de NKA como sua afinidade por cátions e oclusão do K^+. Beta consta de um domínio citoplasmático N-terminal de cerca de 30 resíduos, uma hélice transmembrana alojada no sulco entre M7 e M10 de α e um grande domínio extracelular (ectodomínio) de cerca de 240 resíduos que cobre quase toda a superfície extracelular de Alfa. O principal segmento do ectodomínio de β é estabilizado por 3 pontes dissulfeto e é uma dobra semelhante àquela das moléculas de adesão como nectinas. Com efeito,

a subunidade β2 funciona como molécula de adesão na glia de ratos. A subunidade β possui ainda 1 a 3 protuberâncias e 2 a 4 sítios potenciais de glicosilação que variam conforme a isoforma e podem regular a dimerização. Por exemplo, a dimerização de β1 pode ser bloqueada por uma protuberância específica (resíduos 190-209) que esá ausente nas isoformas humanas β2 e β3. Ainda, os açúcares podem ter ação direta nos contatos célula-célula. A hélice transmembrana de β corre paralela a M7 de α fazendo contatos com esta e com M10 através de dois agregados ricos em resíduos aromáticos (TOYOSHIMA, KANAI, CORNELIUS, 2011).

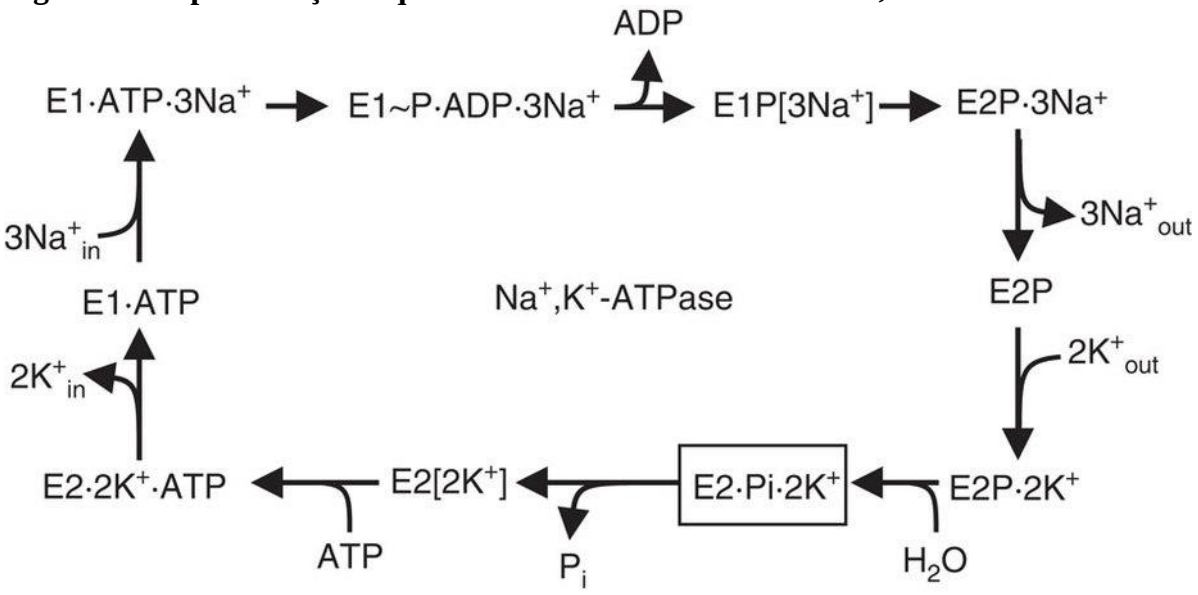
A subunidade γ ou FXYD pertence a uma família de proteínas que possui uma sequência de aminoácidos Phe-X-Tyr-Asp. Ela sofre variantes de splicing, é expresa de modo tecido específico e é tradicionalmente conhecida por subunidade Gama (γ) (FXYD2) no rim e por fosfoleman (FXYD1) no miocárdio. Esta subunidade modula a afinidade da enzima por Na^+ e K^+ e é um importante alvo de fosforilação. Por exemplo FXYD1 interage com as isoformas α1β nos músculos esquelético e cardíaco e com as isoformas gliais α2β e neuronais α3β no cerebelo. FXYD7 é expressa exclusivamente no cérebro e interatua com α1β neuronais e gliais.

1.3.1 NKA: ciclo catalítico

A "teoria E_1/E_2" ou "esquema de Post-Albers" explica a ação de bombeamento por uma sucessiva alternância de afinidade dos sítios transmembrana de ligação a cátions (TOYOSHIMA et al., 2011). A subunidade α existe em duas conformações: um estado E_1 ativo defosforilado com alta afinidade por Na^+ e um estado E_2 fosforilado com baixa afinidade por Na^+ e afinidade aumentada por K^+ (BENARROCH, 2011; KLIMANOVA et al., 2015). Nos estados E1, os sítios de transmembrana de ligação a cátions estão voltados para o citoplasma, enquanto que nos estados E_2 estes sítios estão direcionados extracelularmente. Os sítios de ligação para cátions são dois (I e II) e se rearranjam para acomodar 2 Na^+, enquanto que o terceiro Na^+ liga-se a um sítio diferente (III) que interage com a porção carboxiterminal ativando a fosforilação da enzima. Para evitar um curto-circuito tipo canal, o sistema possui duas comportas, uma no lado extra e outra no lado intracelular. Uma etapa crítica do ciclo reacional da NKA, e aliás de todas as ATPases tipo P, é a autofosforilação e autodefosforilação de um resíduo de aspartato específico e altamente conservado. A ligação de 3 Na^+ ao sítio de ligação a cátions induz, em presença de um Mg^{+2}, a transferência de uma fosforila do ATP para o resíduo de aspartato e o consequentre travamento da comporta citoplasmática produzindo o estado intermediário de alta energia referido como $3Na^+E_1$~P. Uma mudança conformacional do estado E_1~P para o E_2~P lava à abertura da comporta extracitoplasmática e extrusão dos 3

Na^+. A seguir, os 2 K^+ ocupam os sítios de ligação a cátions induzindo a hidrólise do resíduo de aspartilfosfato e o travamento da a comporta extracelular. Este estado de baixa energia é estável e sua transição para o estado E_1 é muito lenta quando a [ATP] é baixa. A interação de resíduos de Tyr na porção carboxiterminal com a Arg^{935} é numa etapa crucial tanto para a ativação da fosforilação de E_1 pelo terceiro Na^+ quanto para o retorno do estado E_1~P para o E_2~P (BENARROCH, 2011; TOYOSHIMA, KANAI, CORNELIUS, 2011).

Figura 5 – Representação esquemática do ciclo reacional da Na^+,K^+-ATPase



Fonte: Adaptado de Ogawa et al., 2015

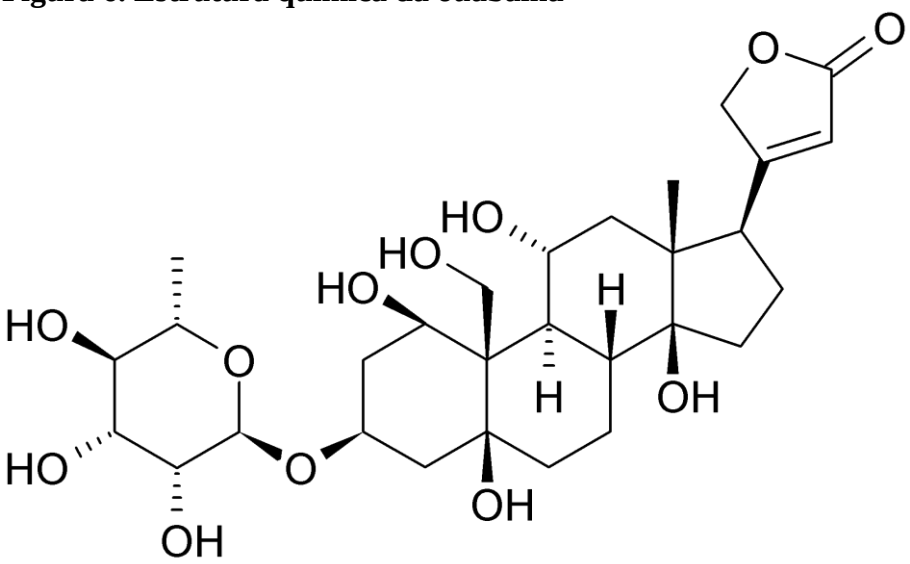
1.3.2 Ouabaína e esteróides cardiotônicos (ECT): estrutura molecular e interação com NKA

O termo ouabaína (sinônimo de acokantherina e strophanthina-g) vem do Francês *ouabaïne* que por sua vez, deriva de *waba'aïo* que significa "veneno de flecha" no dialeto dos aborígenes Somali da África oriental (Etiópia, Gabão, Quênia, Ruanda, Somália e Tanzânia) e designa certas plantas do gênero *Acocanthera* (nomeadamente *A. ouabaio*) usadas por eles, como sugere o nome, no preparo de flechas envenenadas. A ouabaína (Figura 6) foi isolada por Arnaud em 1888 a partir de *Acocanthera sp.* (Anexo A) e, logo após, de *Strophantus sp.* (Anexo B) procedentes do Gabão, então colônica francesa (JACOBS, BIGELOW, 1932).

A ouabaína pertence à classe química dos esteróides cardiotônicos (ECT) de vasta ocorrência nos reinos animal e plantas. Os ECT se dividem em: 1) bufadienolídeos, encontrados nas secreções paratóides dos bufonidæ, que caracteristicamente possuem uma lactona insaturada de 6 membros ligada ao C17 (Figura 7) e 2) cardenolídeos, encontrados em scrophulariaceæ, apocynaceæ e asparagaceæ etc, que caracteristicamente possuem uma lactona

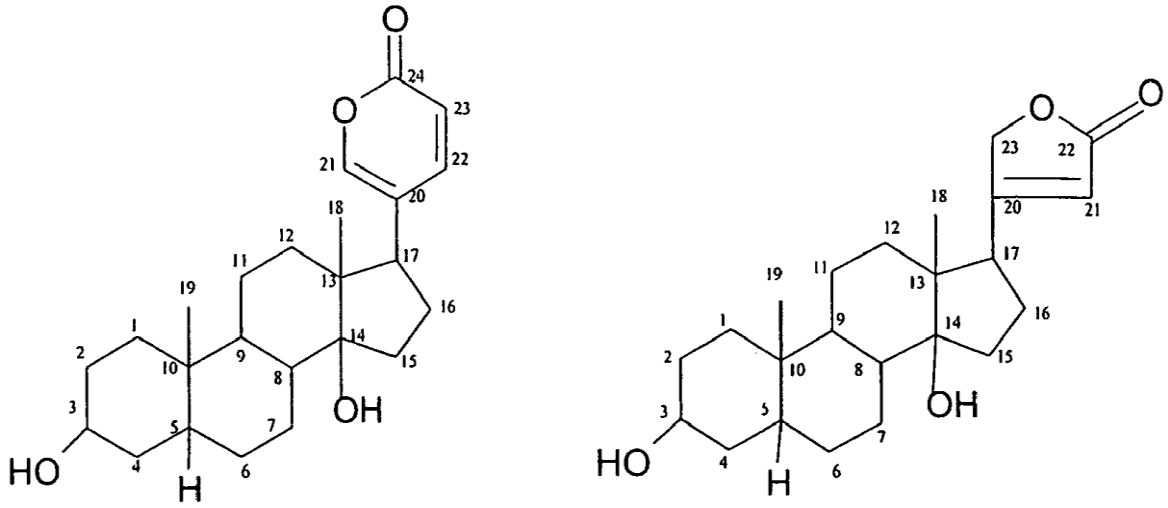
saturada de cinco membros ligada ao C17 esteroidal (Figura 7) (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2014). A ouabaína é um dos ECT mais hidrossolúvies em virtude das várias hidroxilas na face β do núcleo esteróide (KLIMANOVA et al., 2015).

Figura 6. Estrutura química da ouabaína



Fonte: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/o3125?lang=pt&region=BR

Figura 7. Estrutura química básica dos cardenolídeos e dos bufadienolídeos



Bufadienolídeo Cardenolídeo

Fonte: Adaptado de Calderón-Montaño et al., 2014 e Klimanova et al., 2015

A ligação dos ECT ao lado extracelular de NKA, com K_d subnanomolar nos casos mais eficientes, é promovido, não exclusivamente, pela fosforilação da enzima. É bem estabelecido que o K^+ antagoniza esta ligação por acelerar a transição de estado $E_2P \rightarrow E_2.2K^+$. No entanto

a ligação de ECT estabiliza a oclusão do K^+ no estado $E_2.2K^+$, embora com baixa afinidade (K_d de ordem mM). Pensa-se que em condições fisiológicas os ECT estabilizam o estado $E_2P.2Na^+$. As moléculas de ECT constam de três componentes principais: 1) uma lactona de 5 a 6 átomos, 2) um núcleo esteróide e 3) uma porção sacarídica de 1 a 4 resíduos que variam de tri- a pentoses. Características importantes para a interação dos ECT com NKA são: presença de lactona insaturada ligada a C17, configuração em cadeira do núcleo esteroidal, presença de OH em C14 e presença de uma ose adequada ligada a C3. A ouabaína, por exemplo, tem uma lactona de 5 membros e ramnose como carboidrato.

A estrutura cristalina de NKA no estado $E2.2K^+MgF_4^{-2}$ com ouabaína a 20 mM em resolução de 2,8 Ä (OGAWA et al., 2009) explica a importância destas características e como o K^+ reduz a afinidade de NKA por ouabaína milimolar. Na estrutura cristalina, a molécula de ouabaína está profundamente cravada como uma cunha no domínio transmambrana de forma que o anel lactônico fica muito próximo aos sítios de ligação do K^+, desenrolando parcialmente a hélice M4 de α enquanto que a ramnose interage com a alça entre L7 e L8 de α. Isto corrobora a identificação de resíduos críticos em extensos estudos de mutagênese sítio-direcionada. O desenrolamento parcial de M4 de α requer que a carbonila da lactona desloque e substitua a carbonila de Gly^{326} da hélice M4 para formar uma ponte de H. Assim, o correto posicionamento da carbonila lactônica é essencial e a ligação de K^+ irá prejudicar a ligação de ECT. Por outro lado a liberação de K^+ é bloqueada pela ligação do ECT.

O núcleo esteroidal sofre empilhamento com resíduos de Phe nas hélices M4 e M5 de α, requerendo para tanto a configuração de cadeira do núcleo. A hidroxila de C14 forma uma ponte de H com Thr^{804} situada próximo da extremidade extracelular de M6 de α. A ramnose parece formar pontes de H com resíduos extracelulares de M4 e de uma alça entre L7 e L8 de α. De início, a cavidade de ligação do ECT não é suficientemente grande e tem de ser aumentada por rearranjo das hélices transmembranares. Na forma de baixa afinidade, o movimento das hélices M1 e M2 é muito restringido pela ligação do K^+, e se formam superfícies complementares apenas entre M4-M6 e o lado α do núcleo esteroidal. No entanto, na forma de alta afinidade, sem a ligação do K^+, as hélices M1 e M2 podem aproximar-se o suficiente para estabelecer pontes de H com hidroxilas na face β do esteróide. Como os resíduos que interagem com o núceo esteroidal são extremamente conservados, parece que os resíduos que interagem com a porção sacarídica dos ECT são o único local possível de conferir especificidade por isoformas (TOYOSHIMA et al., 2011). Os ECT são capazes de inibir a atividade enzimática

ATPásica da NKA mediante ligação de alta afinidade com o estado E2P (KLIMANOVA et al., 2015).

1.3.3 ECT exógenos: uma visão tradicional

Os cardenolídeos, icialmente sob forma de extratos vegetais (dedaleiras, *Digitalis purpurea* e *D. lanata*), tiveram seu uso no tratamento sintomático da insuficiência cardíaca congestiva (ICC) assentado em bases científicas na medicina ocidental por Withering em 1785 (LEE, HENDRIKS, 2015; STUCKY, GOLDBERGER, 2015), mas seu uso leigo é mutio anterior (FORNACIARI et al., 2015).

A digoxina é ainda usada no tratamento da ICC, especialmente quando associada a fibrilação ou *flutter* atriais, mas seu uso tem sido recentemente questionado devido a evidências controvertidas de aumento do risco de morte geral (LEE, HENDRIKS, 2015). A ouabaína foi usada com o mesmo fim, com a limitação de somente poder ser administrada por via intravenosa (*i.v.*) dada sua alta polaridade rejudicar uma absorção adequada por via oral.

O lanatosídeo C pode ser administrado por vias oral e intravenosa e vem sendo pouco usado no tratamento de ICC associada a taquicardia supreventricular de alta resposta, finalidade com que tem sido substituído por antiarrítmicos como adenosina em ambiente hospitalar (informação verbal)[6]. Outros cardenolídeos foram usados no arsenal terapêutico da ICC em escala nacional em certos países devido a questões comericais; citam-se como exemplo a convalotoxina de *Convallaria majalis* (lírio-do-vale) na Rússia e a neriina de *Nerium oleander* (espirradeira) na Índia (KRISHNA et al., 2015). Os bufadienolídeos, sob forma de *chan-su* (extrato de glândulas paratóides de sapos, bufonidæ), por sua vez, tem sido usados na medicina tradicional chinesa há mais de mil anos (PERERA CÓRDOVA et al., 2016; ZULFIKER et al., 2016).

Ambas as classes esteroidais tem, contudo, voltado a atrair o interesse científico, agora no desenvolvimento de moléculas anticâncer (DONG et al., 2011; HU et al., 2011; ZHANG et al., 2013 PARK et al., 2014) e ainda como neurosteróides (i.e. esteróides sintetizados em células nervosas) com funções parácrina e autócrina envolvidas em distúrbios do sistema nervoso (MISHRA et al., 2013; ORELLANA et al., 2016).

Os ECT são ligantes específicos da NKA, de cuja atividade são moduladores alostéricos negativos. O sítio de ligação a ECT da NKA é altamente conservado, inclusive filogeneticamente, o que sugere fortemente um papel fundamental na regulação de processos

[6] Informação verbal fornecida por: Manoel Cláudio Azevedo Patrocínio, M.D., Ph.D.

fisiológicos (TOYOSHIMA, KANAI, CORNELIUS, 2011), fato que seria posteriormente verificado.

Em 1953 Schatzmann documentou que a então conhecida inibição pela ouabaína do transporte de ativo de potássio e sódio através da membrana de eritrócitos era dependente da ligação específica daquele esteróide a uma fração protéica isolada e altamente purificada do plasmalema. Não obstante, o crédito pela descoberta da NKA, sacramentado pela láurea do Nobel de fisiologia e medicina de 1992, pertenceu a Jens Skou, que somente em 1957 reputou a fração protéica com atividade ATPásica que liga especificamente à ouabaína, por ele purificada a partir do nervo isquiático de caranguejos, como sendo o aparelho enzimático chamado "adenosina-trifosfatase sódio-pótássio ativada" responsável pelo transporte ativo destes íons através da membrana celular anteriormente identificado (SKOU, 2005). A descoberta de uma proteína receptora para os esteróides cardiotônicos exógenos ensejou que Albert Szent-Györgyi, Nobel de fisiologia e medicina de 1937, ainda em 1953, especulasse sobre a existência de um ligante endógeno para este receptor, iniciando então uma busca sistemática por estas moléculas. (KIM, LABELLA, 1981).

A partir destes achados ficou claro que, além da difusão do sódio e do potássio por canais de membrana, os gradientes destes íons eram gerados e restaurados pelo transporte ativo primário (i.e.: à custa de ATP) através de NKA. Porém a relação entre o aumento da $[Na^+]_i$ devido à inibição de NKA e a principal ação farmacológica dos esteróides cardiotônicos, (*v.g.:* o aumento do inotropismo cardíaco) parecia sem nexo até que Reuter e Seitz (1968) e Baker e colaboradores (1969) reunissem indícios da existência de um torcador iônico sódio-cálcio que seria clonado, caracterizado e nomeado NCX (*natrium-calcium exchanger*) por Nicoll e colegas (1990).

1.3.4 ECT endógenos: uma nova classe hormonal

Pesquisadores como Gruber e Whitaker (1980), Lichtstein e Samuelov (1980) e Hamlyn et al., (1982) relataram a ligação altamente específica de anticorpos antidigoxina a tecidos humanos e animais. Alguns autores alegaram que moléculas esteroidais como sais biliares eram responsáveis por reação cruzada com aqueles anticorpos. Valdés Jr. e Graves (1984), Castañeda-Hernández e Godfraind (1984), Crabos et al. (1984), entre outros, isolaram substâncias presentes no plasma e na urina humanos em conentrações nanomolares e lhes apontaram como sendo os "fatores imunorreativos tipo digoxina" (*digoxin-like imunoreactive factors* - DLIFs). No entanto geralmete se atribui a Hamlyn e colaboradores (1991) a descoberta

da “ouabaína endógena” que, junto com a marinobufagenina endógena constitui os chamados “ECT endógenos”, cuja existência continua polemizada (BAECHER et al., 2014; (BLAUSTEIN, 2014; LEWIS et al., 2014), apesar da recente elucidadação da biossíntese da marinobufagenina endógena via cascata de síntese dos ácidos biliares iniciada pela anzima CYP27A1 (FEDOROVA et al., 2015) e da estimulação desta síntese juntamente com a da aldosterona pelos receptores AT2 no córtex adrenal a qual está suprarregulada durante a sobrecarga de sódio em animais experimentais e em situações clínicas como a gestação e as insuficiências renal e cardíaca (BLAUSTEIN, 2014, 2015, 2016; HAMLYN, MANUNTA, 2015; SIMONINI et al., 2015; SONG et al., 2014). A gestação é uma particular condição de hiperouabainemia associada a uma resistência à sua ação contraturante sobre o músculo liso vascular périférico, havendo reversão da desensibilização ao efeito hipertensiogêncio da ouabaína na pré-eclâmpsia (PUSCHETT, AGUNANNE, UDDIN, 2010; MA, J et al., 2012).

Outra condição em que há distúrbio da regulação da secreção de ouabaína endógena é o transtorno do humor bipolar (THB) (EL-MALLAKH et al., 2010; HUFF et al., 2010). Digno de nota é que a hipertensão atinge 47 a 68% da população com THB, sendo a comorbidade não psiquiátrica mais prevalente deste transtorno. Também os distúrbios cardiovasculares são a 2ª causa de morte mais incidente depois do autoextermínio nesta população (BIRKENAES et al., 2007; FLEISCHHACKER et al., 2008; VANCAMPFORT et al., 2013; WESTMAN et al., 2013).

1.3.4.1 Interações proteína-proteína: NKA como um transdutor de sinal

Tem sido relatadas interações de NKA com outras proteínas, iniciamlemte no miocárdio em 2006 e, a partir de então, em outros tecidos. Com efeito, uma extensão N-terminal de aproximadamente 40 resíduos de AA, especícifica da NKA, rica em lisina e susceptível a fosforilação regulatória pela proteinocinase C (PKC) é uma provável plataforma de interação com outras proteínas. Entre estas proteínas incluem-se o receptor de IP_3, a cinase Src, caveolina-1 e a agrina; e a ativação de diversas vias de sinalização intracelulares tem sido atribuída à ligação de NKA a esteróides cardiotônicos (ECT), inclusive em concentrações nanomolares ou subnanomolares (XIE, ASKARI, 2002; KIM et al., 2008; 2013; ZHANG et al., 2008; RIEGEL et al., 2009; LIU, XIE, 2010; YU et al., 2010; 2011; DAI et al., 2013; VALVASSORI et al., 2015), independentemente de tais concentrações serem ineficazes em inibir a atividade catalítica de NKA *in vitro* (KLIMANOVA et al., 2015). Isto sugere a modulação de extensas redes intercomunicantes de transdução de sinal pelos ligantes endógenos da NKA, os esteróides

ECT endógenos. Ademais tem sido demonstrada a importância da subinidade β na adesão celular como lectina potássio-dependente, podendo ser implicada no desenvolvimento e na progressão de alguns tipos de neoplasias, tornando-se alvo farmacológico potencical em diversas situações (TOYOSHIMA et al., 2011). Existem relatos de acoplamento estrutural molecular (além do acoplamento funcional já bem documentado) de NKA ainda com proteínas como transportador de glicina GlyT2 (DE JUAN-SANZ et al., 2013), transportador de glutamato GLT-1 (ROSE et al., 2009) e trocador iônico Na^{+}-Ca^{+2} (NCX) (JUHASZOVA; BLAUSTEIN, 1997).

1.4 Estresses oxidativo e nitrosativo

Segundo Valko e colaboradores (2007), os radicais livres podem ser definidos como átomos, moléculas ou fragmentos moleculares que contem um ou mais elétrons (e^{-}) desemparelhados em orbitais atômicos ou moleculares. Este e^{-} desemparelhado usualmente confere considerável reatividade química ao espécime químico que o contém. Apesar de a produção excessiva de radicais livres com suas consequências deletérias se associarem a diversas condições patológicas, a produção controlada de radicais livres é essencial em alguns mecanismos de transdução de sinal fisiologicamente relevantes.

O oxigênio molecular (O_2) possui um elétron livre nos orbitais externos de cada um de ambos os átomos e portanto é um radical livre, mas sua reatividade com compostos não radicalares é muito limitada pelo fato de estes dois elétrons terem o mesmo estado de rotação (*spin*). Em sistemas vivos, as espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs) são de longe os mais importantes radicais livres. O "arrebatamento" de um e^{-} por uma molécula de O_2, quer em processos metabólicos, quer pela ativação do O_2 por radiações origina o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), que é considerado o ERO primordial. Partindo do $O_2^{\bullet -}$ são gerados EROs secundários principalmente por processos catalisados por cátions de metais de transição ou por enzimas.

A maior fonte de $O_2^{\bullet -}$ nas células é a mitocôndria. Estudos mostram que 1-3% dos e^{-} escapam prematuramente na cadeia de transferência de elétrons (CTE) para o O_2 formando $O_2^{\bullet -}$ ao invés de contribuir para reduzir O_2 a H_2O e isto está implicado na fisiopatologia de diversas doenças. O $O_2^{\bullet -}$ é produzido nos complexos I e III da cadeia de transferência de elétrons. O complexo I é responsável pela liberação de $O_2^{\bullet -}$ na matriz mitocondrial, indetectável no espaço extramitocondrial de mitocôndrias intactas. Isto se adapta bem com a proposição de sítio de vazamento de e^{-} nos agregados de ferro-enxofre (Fe-S) dos braços hidrofílicos que fazem protrusão na matriz. Experimentos com complexo III, por sua vez, mostram liberação

extramitocondrial de $O_2^{\bullet -}$, mas medições de formação de H_2O_2 indicam que este último processo conta para <50% do total de escape de e^- mesmo em mitocôndrias sem Cu,Zn-SOD funcionante. Assim, tem sido proposto que os restantes 50% são devidos a liberação de $O_2^{\bullet -}$ para a matriz.

O radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), forma eletricamente neutra do íon hidroxila (OH^-) é a mais reativa e danosa forma de ERO, com uma meia-vida *in vivo* de 10^{-9} s. Assim, o $^{\bullet}OH$ formado reage rapidamente próximo do local de geração. O estado RedOx de uma célula é fortemente relacionado com o par de óxido-redução de ferro ($Fe^{+2} \leftrightarrow Fe^{+3} + e^-$) e é mantido dentro de um limite fisiológico estrito. Tem sido sugerido que a homeostase do ferro assegura que não haja íons ferrosos ou férricos "livres" na célula em circunstâncias fisiológicas. Entretanto, em situações de estresse *in vivo*, o $O_2^{\bullet -}$ libera estes cátions de moléculas que os quelatam, criando um *pool* de ferro "livre". Este processo foi demonstrado para enzimas da família das desidratases-liases, que contêm agregados 4Fe-4S. O Fe^{+2} assim liberado toma parte na chamada "reação de Fenton", que catalisa a cisão heterolítica do peróxido de hidrogênio em um radical hidroxil e um íon hidroxila com oxidação do cátion fesrroso a férrico (VALKO et al., 2007):

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

O $^{\bullet}OH$ formado na reação de Fenton é substrato da reação de Haber-Weiss, a qual combina uma reação de Fenton com a redução de Fe^{+3} pelo $O_2^{\bullet -}$ produzindo Fe^{+2} e O_2:

$$Fe^{+3} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{+2} + O_2$$
$$\underline{Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + \bullet OH + OH^-}$$
$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + \bullet OH + OH^- + O_2$$

Uma forma adicional de EROs são os radicais derivados de peroxil, dos quais a forma mais simples é o peroxil protonado ($HOO^{\bullet}$), havendo também os peroxis orgânicos ($ROO^{\bullet}$). Tem sido demonstrado que os radicais $HOO^{\bullet}$ são os iniciadores do processo de lipoperoxidação por duas vias paralelas: 1) via independente de radical lipoperoxila (LOOH); 2) via dependente de LOOH. Na via LOOH dependente.

O óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), por conter também um e^- desemparelhado, é um radical livre relativamente estável, com uma meia-vida de alguns segundos em meio aquoso. Ele pode ser

gerado juntamente com a citrulina a partir da arginina (Arg) pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS) de que se conhecem 3 isoformas: uma endotelial (eNOS), uma neuronal (nNOS) e uma indutível (iNOS). O $NO^{\bullet}$ é uma molécula relativamente abundante e de ocorrência difusa em muitos órgãos e tecidos onde atua sobre a guanilato ciclase e assume papeis de sinalização biológica em processos fisiológicos tais como neurotransmissão, controle do tônus vascular, relexamento de músculo liso, e mecanismos de defesa e regulação imunes. Estes mecanismos estão associados à capacidade do $NO^{\bullet}$ de se ligar de maneira reversível a tióis protéicos catalisando a formação de pontes dissulfeto destes com tióis não protéicos (*e.g.*: S-glutationilação) e com sua capacidade de ligar a hidroxilas alílicas ou arílicas da cadeia lateral de certos aminoácidos, prevenndo a fosforilação das mesmas, a qual se sabe ter um papel regulatório em muitas proteínas. Também o $NO^{\bullet}$ pode causar deslocalização eletrônica modificando a afinidade de proteínas por seus respoectivos substratos ou ainda complexar-se com metais de transição em lugar de oxigênio, modulando enzimas que contém quelatos de ferro como centro prostético (PACHER, BECKMAN, LIAUDET, 2007; COBB, COLE, 2015).

No entanto, a hiperprodução de $NO^{\bullet}$ e demais espécies reativas de nitrogênio (ERNs) superando da capacidade de tamponamento pelos sistemas redutores pode acarretar consequências danosas, o chamado estresse nitrosativo, que tem sido documentado em diversas condições patológicas. Nas situações em que as produções de $NO^{\bullet}$ e de $O_2^{\bullet-}$ estão aumentadas, ocorre a formação do ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), um radical extremamente danoso responsável por oxidação de lipídios e fragmentação do DNA (VALKO et al., 2007; COBB, COLE, 2015):

$$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^-$$

Dado a produção contínua de radicais livres mesmo em situações fisiológicas, os organismos desenvolveram contra danos oxidativo e nitrosativo uma série de mecanismos de defesa que estão grandemente interconectados. Estes mecanismos de defesa incluem: 1) mecanismos preventivos; 2) mecanismos de reparo; 3) defesas físicas; 4) defesas antioxidantes. As defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidade (GPx)). As defesas antioxidantes não enzimáticas incluem a glutationa (GSH), a tioredoxina (TRX), a cisteína (Cys), o α-tocoferol (vitamina E), o ácido dihidroascórbico (vitamina C), o ácido α-lipóico (ALA), entre outros (flavonóides, carotenóides etc).

O GSH, cuja forma oxidada é o dissulfeto de glutationa (GSSG) é um tripeptídeo formado por duas etapas reacionais sequenciais mediadas pela glutamato-cisteína ligase e pela glutationa sintetase no citosol e atinge concentraçõees elevadas no citosol (1-11 mM) e no núcleo (5-11 mM) onde constitui a principal defesa antioxidante solúvel. O GSH não é produzido na mitocôndria, mas atinge altas concentrações (~8mM na matriz) nesta organela, sendo para tanto transportado por dois antiportadores eletricamente neutros (proteína carreadora de dicarboxilato e proteína carreadora de 2-oxoglutarato). A razão de GSH/GSSG é uma boa medida do estado de estresse oxidativo em um tecido.

Os principais papeis de GSH como defesa antioxidante incluem: 1) papel de cofatos enzimático de enzimas como a glutationa peroxidase, das glutationiltransferase entre outras; 2) participação no transporte de aminoácidos através de membranas 3) *per se* é capaz de capturar radicais $^{\bullet}OH$, $NO^{\bullet}$ e oxigênio singleto 4) é capaz de reduzir a forma oxidada regenerando a forma reduzida ativa da maioria dos principais antioxidantes (α-tocoferol, ácido dihidroascórbico) (VALKO et al., 2007).

1.5 Justificativa e Relevância

A epilepsia afeta cerca de 65 milhões de pessoas, 1% da população mundial, (MOSHÉ et al., 2015). Segundo Engel Jr. e Schwartzkroin (2006), o pesado ônus social, econômico e pessoal desta doença deve-se preponderantemente às crises não controladas, sublinhando a necessidade da pesquisa de novas abordagens de diagnóstico, tratamento e prevenção da epilepsia e de suas consequências.

Os FAE de segunda geração, desenvolvidos nas últimas duas décadas, possuem espectro de eficácia nos mesmos cenários clínicos dos FAE mais antigos com o diferencial do melhor perfil de efeitos adversos e de tolerabilidade que conduziu à sua ampla aceitação pelos clínicos e pelas pessoas com epilepsia (YACUBIAN, CONTRERAS-CAICEDO, RÍOS-POHL, 2014). Não obstante, os novos antiepilépticos falharam em modificar a prevalência de epilepsias farmacoresistentes, que permanece inalterada, girando em torno de 33% (REJDAK et al., 2011; 2014) a 40% dos pacientes (BAULAC; PITKÄNEN, 2009; SCORZA et al., 2016).

Muito desta falha tem sido atribuído à aplicação dos modelos do ECM e do PTZ nos últimos 70 anos, compondo o chamado “paradigma clássico” do desenvolvimento de FAE. Estes modelos tem tem valor preditivo para crises generalizadas dos tipos tônico-clônico e ausência, respectivamente. Todavia seu valor preditivo para outros tipos de crise como as mioclônicas e as focais é baixo. Isto levou a questionamentos de que seu uso intensivo provocou

o descarte prematuro de substâncias potencialmente eficazes nos demais tipos de crises, o que explicaria em parte a elevada prevalência de epilepsias pouco responsivas ao tratamento (WHITE et al., 2006; LÖSCHER, 2011; BRANDT et al., 2015). Assim, existe uma demanda crescente e insatisfeita por modelos que recapitulem tipos de crises pouco responsivas, como as mioclônicas, ao lado de apresentarem um bom valor preditor.

No que tange o *SE*, as diretrizes terapêuticas vigentes permanecem essencialemnte inalteradas há três décadas (GLAUSER et al., 2016), assim como a mortalidade desta condição no mesmo período (BAULAC, PITKÄNEN, 2009; TRINKA, HÖFLER, ZERBS, 2012). As diretrizes baseiam-se em FAEs de 1ª geração como benzodiazepinas (primeira escolha para o rápido controle da crise), barbituratos, fenitoína, levetiracetam e valproato como segunda escolha e anestésicos gerais como o propofol na terceira linha em caso de resistência aos anteriores. O esteio terapêutico do *SE* é, portanto, formado de agonistas $GABA_A$ e bloqueadores de canais iônicos. operados por voltagem

Excetuando-se o uso inicial de benzodiazepinas em t_1>5 minutos, o corpo de evidência randomizada apoiando as condutas da segunda e terceira linhas é escasso, tornando a conduta a partir deste ponto essencialmente empírica. Além disso, existem indícios de desinibição córtico-hipocampal com a classe dos anestésicos gerais, a qual pode acarretar consequências nefandas sobre o controle das crises e o prognóstico neurológico a longo prazo (SHORVON, TRINKA, 2011). A incorporação de novas classes farmacológicas poderia contribuir para melhorar a efetividade das diretrizes terapêuticas e, consequentemente, dos desfechos do *SE*. Mas a efetividade dos novos antiepilépticos pouco tem sido avaliada nesta condição particular, e investigações pré-clínicas em modelos de *SE* serão uma etapa importante nesse sentido.

A farmacoresistência, diversamente da farmacorefratariedade, pode ser suplantada ou pelo aumento da dose ou da concentração tissular do fármaco (LÖSCHER, 2006) ou pela associação de fármacos com mecanismos diferentes, a assim chamada “politerapia racional”. Entretanto a translacionabilidade clínica de associações terapêuticas altamente eficazes no cenário experimental permanece limitada em virtude do comprometimento da segurança pelos efeitos tóxicos (principalmente instabilidade hemodinâmica) pela adição ou potencialização de tais efeitos na politerapia (LÖSCHER, 2006; BRANDT et al., 2015; KLEE et al., 2015).

Para se ter uma ideia, a única combinação com nível I de evidência clínica é aquela composta por diazepam mais fenitoína. Necessita-se, portanto, de mais evidências pré-clínicas e clínicas que clarifiquem o papel da politerapia no cenário clínico do *SE*, e modelos animais deverão contribuir para preencher esta lacuna (LÖSCHER, 2015).

Assim, existe uma recente demanda, ainda não suprida, pela caracterização de novos modelos de crise epiléptica que tenham um espsctro de valor preditivo diferente dos já existentes ou que possam servir ao estudo de mecanismos de ictogênese bem como à validação de alvos terapêuticos. Em linha com isto, grupos de pesquisa ao redor do mundo tem desenvolvido e caracterizado modelos inovadores com o fim de estudar mecanismos moleculares de farmacoresponsividade e de farmacoresistência, na tentativa de desenhar intervenções intencionalmente direcionadas para abordar estes últimos (CZUCZWAR et al., 2009; GARCIA-CAIRASCO et al., 2013; REJDAK et al., 2011; 2014).

No que toca à caracterização farmacológica do modelo de crises epilépticas por ouabaína *i.c.v.*, o grupo liderado por André Barbeau, numa série de trabalhos publicados entre 1972 e 1978, relatou efeitos antiepilépticos do pré-tratamento com taurina e GABA (IZUMI et al., 1973a), bem como da melatonina e o efeito pró-convulsivante do α-MSH (IZUMI et al., 1973b). Os mesmos pesquisadores observaram que o pré-tratamento com fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, clonazepam ou fenacemida, mas não com etosuximida, são capazes de prevenir as crises epilépticas por ouabaína, e pontuam que o modelo tem valor preditor para substâncias efeivas contra crises generalizadas tônio-clônicas (DAVIDSON et al., 1978). Della-Pace e colaboradores (2012) observaram que o TTHL, um triterpenóide de *Combretum leprosum*, preveniu as crises epilépticas e as descargas epileptiformes eletroecefalográficas induzidas por ouabaína em camundongos. **Apesar destes dados, não há investigações com protocolos de reversão do *SE* por ouabaína nem ensaios de eficácia de antiepilépticos de segunda geração no modelo.**

No que tange a neuroquímica do modelo das crises epilépticas, Izumi e coolaboradores (1973c) averiguaram a concentração de monoaminas (norepinefrina, dopamina e serotonina) nas áreas cerebrais hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo. Estes pesquisadores relataram aumento de 5-HT em hipocampo e diminuição de norepinefrina no mesencéfalo. **Não existem dados sobre estresses oxidativo ou nitrosativo por ouabaína em dose convulsivante, mas apenas em dose subconvulsivante.**

A interpretação destes dados farmacológicos e neuroquímicos é dificultada por várias causas. O grupo de André Barbreau (a que pertencem Izumi e Davidson) usou doses ouabaína de 5 µg diluídas em um volume de injetato quase sempre de 50 µL (IZUMI et al., 1973c; DAVIDSON et al., 1978). Tendo em conta o volume de 43 µL do ventrículo leteral no rato macho idoso de 370-450 g (KUO, SMITH, 2014), considera-se hoje demasiado alto o volume de injetato de 50 µL para a via *i.c.v.*. Este volume difunde-se imediatamente para áreas distantes

como treceiro ventrículo e aqueduto do mesencéfalo, enquanto que os 5 µL, usados por pesquisadores modernos como El-Mallakh e Quevedo (e no presente trabalho), fica inicialmente restrito ao ventrículo lateral, assumindo, de início, maior importância os sítios de ação em estruturas da parede do ventrículo lateral.

Ainda, o grupo de Barbeau, exceto nos artigos iniciais, usou ratas fêmeas jovens (170-200 g) porque elas apresentam uma incidência de ~100% de crises procursivas e de crises generalizadas clônico-tônicas, enquanto que os machos adultos (226-289 g) apresentam ~81% daquelas e ~30-40% destas (IZUMI et al., 1973a). Seus experimentos foram executados cerca do 2º dia de pós-operatório (DAVIDSON et al., 1978), hoje conseidrado inadequado (KUO, SMITH, 2014). **Tais fatores comprometem a comparação dos achados com a literatura atual, bem como a interpretação dos mesmos**.

Considerando a etologia e a semiologia localizatória, não se conhecem relatos de caracterização comportamental do *SE* por ouabaína e **as especulações reputando o hipocampo como sítio de origem da atividade ictal no *wild running* por ouabaína (DAVIDSON et al., 1978) estão provavelmente equivocadas.**

No que compete ao modelo de comportamento **tipo mania** (hiperlocomoção) por ouabaína *i.c.v.* **(doses subconvulsivantes)**, existem dados de: estresse oxidativo em áreas cerebrais (RIEGEL et al., 2010), em partículas submitocondriais (RIEGEL et al., 2009) e sobre sua prevenção por Li^+ e valproato (JORNADA et al., 2011), melatonina (SOUZA et al., 2014) e diseleneto de difenila (BRÜNING et al., 2012); dano ao DNA (JORNADA et al., 2010); prevenção da diminuição dos níveis de BDNF por estabilizadores do humor (JORNADA et al., 2009); aumento da atividade dos complexos respiratórios mitocondriais I, II e IV em córtex pré-frontal (FREITAS et al., 2011); efeito sobre citocinas e quimiocinas (TONIN et al., 2014) e efeito neuroprotetor dos estabilizantes de humor em vias de sinalização de morte celular desencadeadas por estresse oxidativo (VALVASSORI et al., 2015).

Não se conhece qualquer abordagem do estresse oxidativo e nitrosativo em doses convulsivantes de ouabaína *i.c.v.*. Vale ressaltar que protocolo de *SE* por ouabaína, embora não seja escopo do presente trabalho, **salvo os dados citados sobre monoaminas, não há dados sobre outros neurotransmissores como acetilcolina, aminoácidos, purinas e peptídios, nem dados sobre atividade de enzimas exceto NKA, nem dados sobre tráfego de subunidades de receptores ou transportadores de neurotransmissores entre membrana e compartimentos celulares nem sobre atividade dos transportadores, assim como não há**

dados sobre neuroinflamação, neurotrofinas ou sobre efeitos no material genético, transcrição e tradução.

O modelo de crise epiléptica por ouabaína dificilmente seria é aplicável à triagem de atividade antiepiléptica em larga escala com finalidade de desenvolvimento de FAE, haja vista a disponibilidade de modelos mais tempo- e custo-efetivos com valor preditivo equivalente. Não obstante, **este é um modelo de *SE* que pode se prestar ao estudo de mecanismos de iniciação, manutenção, propagação e terminação da crise epiléptica, e à validação de alvos terapêutucos, e portanto merece estudos aprofundados de caracterização.**

No que assiste à canulação crônica do ventrículo cerebral lateral (via intracerebroventricular, *i.c.v.*) guiada por cirurgia estereotáxica em ratos Wistar, o mesmo procedimento é aplicável a outras áreas cerebrais e permite:

1) a indução de modelos que requeiram a administração intracerebral em animais vigis (i.e.: não sedados) ou que requeiram administração intracerebral crônica em áreas discretas;

2) a avaliação dos efeitos sobre o SNC de substâncias que, pela baixa lipofilicidade, pelo alto peso molecular ou por quaisquer motivos são incapazes de permear a barreira hematoencefálica (BHE);

3) o estudo da atividade intrínseca de substâncias que, por esta via, escapam ao metabolismo sistêmico, mais ainda pela baixa atividade de enzimas metabolizadoras de xenobióticos no parênquima encefálico, proporcionando depuração lentificada e duração de ação prolongada;

4) o uso de doses da ordem de microgramas, vantajosa para substâncias demasiado dispendiosas ou de difícil isolamento ou síntese;

5) a coleta de amostras de fluido cerebrospinal que pode ser usado na análise de: 5.1) substâncias exógenas administradas por via sistêmica, prestando-se à avaliação da sua distribuição no parênquima cerebral; 5.2) concentração de marcadores bioquímicos no mesmo animal seriadamente, sem necessidade de eutanásia.

Em suma, assinala-se a necessidade premente de prover meios, por exemplo modelos, capazes de recapitular componentes do *status epilepticus* em humanos, que sejam úteis para investigação dos mecanismos de farmacoresponsividade e de farmacoresistência bem como para validação de estratégias diagnósticas e terapêuticas, provendo assim evidências pré-clínicas que por seu turno possam ser translacionadas em condutas a ensaiar no cenário clínico. Ademais, evidenciam-se as amplas possibilidades que a implantação de um protocolo operacional padrão de canulação cerebral crônica oferece para aprimorar o desenvolvimento de fármacos e de modelos que atuam sobre o SNC.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracerizar o modelo das crises epilépticas por ouabaína *i.c.v.* desde o processo de administração até a análise de parâmetros etológicos e de estresses oxidativo e nitrosativo em animais experimentais.

2.2 Objetivos específicos

1. Descrever o processo de canulação crônica do ventrículo cerebral lateral (via *i.c.v.*) guiada por estereotaxia em ratos Wistar, (aplicável também a outras áreas cerebrais) avaliando a acurácia da implantação das cânulas no ventrículo lateral por meio de processamento histológico rotineiro e coloração por hematoxilina-eosina seguidas de microscopia de luz comum.
2. Caracterizar o comportamento das crises epilépticas por ouabaína com vistas à neuroetologia de valor localizatório na tentativa de estabelecer os substratos neuroanatômicos deste modelo de crises epilépticas.
3. Averiguar o estresse oxidativo ao termo de uma hora de *SE* nas áreas cerebrais córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo através da medida da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um indicador de peroxidação lipídica das membranas celulares, e da concentração de glutationa reduzida – GSH, um indicador do estado Redox do tecido.
4. Determinar o estresse nitrosativo ao termo de uma hora de *SE* pela medida da concentração de nitrito (NO_2^-) nas áreas estudadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais: *Rattus norvegicus* Wistar machos adultos

Usaram-se inicialmente ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos da linhagem albina Wistar (*c.* 2,5 meses de idade) com 250-350 g de massa corporal por ser esta a faixa de acurácia do atlas utilizado (PAXINOS, WATSON, 1998, 2005; FERRY, GERVASONI, VOGT, 2014). Animais machos foram usados para se eliminar a variação do limiar convulsivo com o ciclo estral, um fenômeno documentado nas fêmeas. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, forradas com raspa de madeira, com tampa de grade de ferro galvanizado, dispondo de água de abastecimento público e ração padrão para roedores com 20% de proteína *ad libitum*, sob temperatura ambiente de 25 ± 1 ºC, com ar refrigerado e ciclo claro-escuro de 12/12 h começando às 7:00 h. Os animais costumam ser recebidos após desmame em lotes com indivíduos de faixas etárias e ponderais heterogêneas, gerando necessidade de recria e de monitoramento da massa corporal individual semanalmente, e mesmo com frequência maior, quando esta ultrapassa os 200 g a partir dos quais os animais soem aumentar de peso *c*. 10 g/ dia (KUO, SMITH, 2014). Os experimentos foram praticados após a anuência do CEPA (parecer 129/2014) em observância da Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei 11794/08, da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA (CONCEA, 2013), da Resolução 1000/2012 (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2012) que regulamenta a eutanásia em animais de laboratório, do Guia para Uso e Cuidados de Animais Laboratoriais do *U.S. Institute of Laboratory Animal Research* (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (FREDERICK NATIONAL LABORATORY FOR CANCER RESEARCH), 2011).

3.2 Via de administração intracerebroventricular (*i.c.v.*): implantação do protocolo

Logo após atingirem a massa corporal mínima adequada (250 g), cada animal foi submetido ao implante de uma cânula de aço inoxidável no ventrículo cerebral lateral (VL) direito guiada por estereotaxia. Grosso modo, o protocolo de estereotaxia usado foi aquele descrito em Ferry, Gervasoni e Vogt (2014); e a manufatura das cânulas guia, de administração e dos mandris foi conforme o descrito em Kokare et al., (2011), com modificações.

3.2.1 Manufatura das cânulas-guia, mandris e cânulas de infusão

Tabela 8 - Materiais para manufatura dos implantes craniais

Instrumento	Matéria-prima	Fabricante
Cânulas-guia	agulhas hipodérmicas 0,55 X 20 mm (24 Gauge X ¾ polegada)	Becton Dickinson, Curitiba, Brasil
Mandris	Fio ortodôntico de Ni-Cr 0,35 mm (0,014 polegada)	Morelli, Sorocaba, Brasil
Cânulas de infusão	agulhas gengivais 30 Guge curta	Misawa Medical Industry Co. Ltd., Kasama, Japão
	tubo de polietileno PE-10 (0,28 mm diâmetro intenro)	Becton Dickinson, Holdrege, EUA
Parafusos	parafusos 0,9 mm de diâmetro para óculos	Otto Frey, Oakland, EUA
Gabarito para corte das cânulas-guia	agulha de aspiração 1,2 x 40 mm	Becton Dickinson, Curitiba, Brasil

Fonte: Elaborada pelo autor

As cânulas-guia (implante) foram feitas a partir de agulhas hipodérmicas 0,55 X 20 mm. As agulhas tiveram os biséis aparados com um disco de corte de SiC (carbeto de silício) montado em uma retífica (RT650KA, Black & Decker do Brasil Ltda., Uberaba, Brasil). Os canos de aço foram separados dos funis de plástico por leves compressões repetidas destes últimos com a parte romba de um alicate, enquanto eram girados entre duas compressões sucessivas para liberar uniformemente pos canos e evitar amassá-los. O cimento que fixa funil e cano foi raspado com ajuda de uma lâmina de bisturi. A seguir, os canos livres foram cortados ao meio e postos no interior de um gabarito de comprimento interno pouco maior que 9 mm construído a partir de uma agulha 1,2 X 40 mm e após isto abradidos nas extremidades para ajustar o comprimento para 9 ± 0,05 mm com auxílio de um paquímetro digital e uma lima fina. Finalmente as cânulas assim obtidas tiveram introduzida e girada no seum lúmen uma agulha gengival curta de 30 Gauge para verificar sua patência e eliminar rebarbas internas e o pó remanescente do disco de SiC. As que apresentaram qualquer obstrução, tortuosidade ou comprimento inadequado foram descartadas.

Os mandris foram feitos de fios ortodônticos de Ni-Cr com diâmetro 0,35 mm. Os fios foram introduzidos dentro de uma cânula guia pronta, dobrando-se a extremidade externa contínua do fio e cortando-a a 1-2 mm.

As cânulas de administração foram feitas com agulhas gengivais de 30 gauge. As agulhas tiveram a parte interna (que vai dentro do tubo de anestésico) cortada com alicate à

altura da borda do funil e tiveram a parte externa introduzida numa cânula guia pronta e cortada a pouco mais de 1 mm de distância da extremidade desta. Os canos foram liberados dos funis por compressões leves com a borda romba de um alicate enquanto se girava a agulha entre duas compressões sucesivas para evitar amassar o cano e liberá-lo uniformemente. Aseguir, as extremidades eram desbastadas com disco de corte de SiC ou com lima fina para eliminar a parte amassada pelo alicate e ajustar o comprimento da cânula de infusão para 1 mm maior que a cânula guia (10 ± 0,05 mm). As cânulas de administração assim obtidas tiveram a patência verificada pelo acoplamento num tubo PE-10 e subsequente infusão de água destilada. As cânulas de comprimento insuficiente, curvas, com com rebarbas, ou obstruídas foram eliminadas.

3.2.2 Cirurgia estereotáxica

Tabela 9 - Fármacos usados na cirurgia estereotáxica

Fármaco	**Dose (mg/kg)**	**via**	**Fabricante**
cetamina	90-100	i.p.	Agener União Saúde Animal, Embu-Guaçu, Brasil
xilazina	9-10	i.p.	Syntec do Brasil Ltda. Cotia, Brasil
cetoprofeno	4	s.c.	Merial Saúde Animal Ltda., Paulínia, Brasil
pentabiótico veterinário para pequenos animais Benzilpenicilina benzatina: 600.000 UI Benzilpenícilina procaína: 300.000 UI Benzilpenicilina potássica: 300.000 UI Diidroestreptomicina: 250 mg Estreptomicina: 250 mg Água destilada: 3 mL	0,2 mL/ animal	i.m.	Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, Brasil
dexpantenol 5%	-	t.o.	Bausch & Lomb, Berlim, Alemanha
lidocaína 2% gel	-	t.d.	Pharlab, Lagoa da Prata, Brasil
iodo-polivinilpirrolidona (PVPI) 1%	-	t.d.	Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil
peróxido de hidrogênio 10 volumes	-	tópico	
lidocaína 2% com adrenalina 0,002%	0,3 mL/ animal	s.c.	Laboratório Bravet Ltda., Rio de Janeiro, Brasil
clorexidina 4%	-	-	-
lactato de Ringer	5 mL/ animal	s.c.	Frezenius Kabi, Aquiraz, Brasil

Intraperitoneal (i.p.); subcutâneo (s.c.); intramuscular (i.m.); tópico oftálmico (t.o.); tópico dermatológico (t.d.)
Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 10 - Material cirúrgico específico da cirurgia estereotáxica

Material	Fabricante
broca de aço esférica 1016 FG 1012 FG	KG Sorensen, Cotia, Brasil
micromotor odontológico tipo peça-de-mão (PM) modelo LB 100	Beltec, Araraquara, Brasil
mandril adaptador PM-FG	Microdont, São Paulo, Brasil
resina acrílica	Vipi Produtos Odontológicos, Pirassununga, Brasil
fio de Nylon 4-0 com agulha de secção triangular	Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil
aparelho estereotáxico EFF 33I	Insight, Campinas, Brasil

Fonte: Elaborada pelo autor

Cada animal foi pesado, anestesiado com cetamina e xilazina e recebeu analgesia pré-emptiva com o AINE cetoprofeno conforme algoritmo para anestesia e analgesia em ratos do Comitê para Cuidados e Uso de Animais da *West Virginia University*, 2011 (Tabela 9). Fez-se antibioticoprofilaxia com pentabiótico veterinário para pequenos aniamis, além de hidratação corneal com dexpantenol. Praticou-se a uma tricotomia ampla com tricótomo elétrico desde posterior às orelhas até anterior aos olhos. Com gel de lidocaína untaram-se as barras auriculares do aparelho de estereotaxia de precisão 100 µm (modelo EFF 33I) e cada nimal foi aposto nas ditas barras e, logo, na barra incisiva, centralizando-se a seguir a cabeça no aparelho estereotáxico e fixando-se-lhe com o clamp nasal. Fez-se desinfecção com iodo-polivinilpirrolidona. Injetaram-se 0,3 mL de lidocaína com adrenalina no subcutâneo no local da incisão e aguardavam-se 3 a 5 minutos. Praticou-se uma incisão da pele e partes moles subjacentes na linha média desde anterior aos olhos até posterior as orelhas; as bordas da ferida foram mantidas afastadas por quatro pinças hemostáticas de Halsted. Divulsionaram-se as partes moles até o periósteo, que por sua vez foi dissecado com elevador periosteal.

Em adição, friccionou-se a calota craniana com *swab* estéril embebido com peróxido de hidrogênio para remover o tecido conjuntivo aderente às suturas e assim evidenciá-las. Colocou-se o implante (cânula externa) no holder da torre do estereotáxico e se lhe fez a verificação de verticalidade. Aferiu-se a coordenada mediolateral (ML) do ponto de referência (Bregma), corrigindo-a por ML de Lambda caso necessário (FERRY, GERVASONI, VOGT, 2014).

Procedeu-se à validação da *flat skull position* (FSP), posição em que as coordenadas dorsoventrais (DV) de Bregma e de Lambda são iguais, com uma tolerância de 0,1 mm para mais ou para menos (PAXINOS, WATSON, 1998, 2005; FERRY, GERVASONI, VOGT, 2014). Verificada a verticalidade do implante e validada a FSP, e de posse das coordenadas ML

e DV de Bregma, aferiu-se a coordenada anteroposterior (AP) e procederam-se aos cálculos da coordenada de ventrículo lateral direito (AP -0,9; ML -1,8 com referência em milímetros a partir de Bregma). Deslocaram-se os micromanipuladores dos eixos AP e ML da torre com o implante sem tocar a calota, alguns milímetros acima dela, até atingir as coordenadas do ponto de trepanação, umedeceu-se a extremidade da cânula guia com uma gotícula de clorexidina 4% e se baixava o micromanipulador DV até que a extremidade da cânula guia tocasse a calvária no ponto onde as coordenadas ML e AP eram as objetivadas, deixando ali a gotícula de clorexidina; logo este ponto era marcado com uma agulha 40 X 1,2 mm girando-se a mesma sobre sua ponta com leve e firme pressão e a seguir trepanou-se naquele ponto com o auxílio de uma broca de aço esférica 1016 FG acoplada a um micromotor odontológico tipo peça-de-mão (PM) através de um mandril adaptador PM-FG. Substituiu-se a broca 1016 FG por uma 1012 FG (Tabela 10) e fizeram-se três trepanações adicionais cerca de 1,5 mm distantes da primeira (geralmente duas frontais bilaterais e uma parietal ipsilateral e posterior à primeira trepanação) de modo a circunscrevê-la no interior de um triângulo. Foram rosqueados três parafusos rosca lenta de 0,9 mm de diâmetro nas três últimas trepanações e foi baixado o micromanipulador DV até um valor idêntico ao de Bregma e, a partir daí, até a coordenada DV do alvo (DV -3,5 mm a partir de Bregma, isto é, 1 mm acima do teto do ventrículo lateral). A seguir, fixou-se o conjunto da cânula guia e três parafusos com resina acrílica e posteriormente irrigou-se o conjunto com salina a 0,9% em temperatura ambiente durante a polimerização da resina, pois esta é uma reação altamente exotérmica. Após a cura da resina, removeu-se o *holder* da cânula guia, obliterou-se esta com o mandril selando o conjunto com cola de poliestireno. Assim ficava pronto o "capacete".

Cabe ressaltar que todos os instrumentos e implantes (parafusos, cânulas guia e mandris) que teriam contato com partes cruentas do animal eram mantidos em água em ebulição até o momento do uso, enquanto que as pinças eram mantidas em um béquer de vidro contendo clorexidina a 4%. Finalmente se aproximavam as bordas da ferida operatória com fio de Nylon 4-0 com agulha de secção triangular (própria para pele), se administravam 5 mL de solução de lactato de Ringer ao animal e se lhe deixava recuperar da anestesia aquecido sob lâmpada incandescente por 1 h e após isto em jaula individual com água e ração *ad libitum*. O animal operado era revisado no 1º dia pós-operatório (DPO), a aprtir de então recebia os cuidados de rotina até a indução.

3.2.3 Indução da crise epiléptica

Procederam-se às injeções *i.c.v.* entre o 5º e o 7º DPO porque neste tempo de tem-se resolução da atividade inflamatória na escara glial, a qual atinge máxima atividade mitótica por volta do 4º DPO. Ademais, intervalos maiores (>10º DPO) podem associar-se com deslocamento da cânula do seu alvo, ainda que sem destacamento do capacete (KUO, SMITH, 2014).

Cada animal foi casualmente alocado em um dos dois grupos: controle (ACSF) ou teste (ACSF + O) (Tabelas 11 e 12) que recebiam respectivamente 5 µL de fluido cerebrospinal artificial sozinho (ACSF – *artificial cerebrospinal fluid*, composição na Tabela 12) ou 29,23 µg/ de ouabaína em 5 µL de ACSF ([ouabaína]=10^{-2} M) por cada animal (RIEGEL et al., 2009). Os animais dos grupos ACSF + O tiveram o comportamento gravado em vídeo digital por 1 h e aqueles dos grupos ACSF por quinze minutos a meia hora.

Tabela 11 - Fármacos injetados via intracerebroventricular

Grupo	Fármaco	Dose	Fabricante
ACSF+O	Ouabaína ≥ 98%	29,23 µg/5µL de ACSF/animal (10^{-2} M)	Sigma Aldrich
ACSF	ACSF	5µL/animal	-

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 12 - Composição química do fluido cerebrospinal artificial (ACSF)

Eletrólito	NaCl	KCl	NaH_2PO_4	Na_2HPO_4	$CaCl_2$	$MgCl_2$	**pH**
Concentração (mM)	125	2,5	0,9	5,0	1,2	1,0	7,4

Fonte Murphy, Maidment, 2002

3.2.3.1 Montagem do sistema de infusão

Sumariamente, carregava-se com corante azul de Evans ou com azul de metileno um tubo PE-10 com 0,26 mm de diâmetro interno (Becton Dickinson) previamente marcado 1/1 centímetro com auxílio de régua e pincel permanente, tendo o cuidado de drenar todas as bolhas so sistema ao fim do processo. A seguir se acoplava o tubo a uma seringa de Hamilton de 10 µL (modelo Gastight 1801 RN, Nevada, EUA) cuja agulha (*point style* nº 3, para septo de silicone em cromatografia gasosa) foi previamente desbastada com lima fina para evitar perfuração e vazamanrto no tubo. Neste ponto, o sistema era enchido e esvaziado com o corante sob pressão ao menos duas vezes para detectar vazamentos. Se os houvesse, era repetia-se a operação. Feito isto, retirava-se a extremidade do tubo distal à seringa ligeiramente do frasco de corante acoplava-se-lhe a cânula de infusão e se aspirava uma bolha de ar de 1-2 cm, mergulhava-se a cânula de infusão no eppendorf contendo a solução a ser injetada (ouabaína 10^{-2} M em ACSF nos grupos teste ou ACSF sozinho nos grupos controle) e se aspirava eté

encher a seringa. Assim se obtinha um sistema composto de uma seringa de 10 µL cheia de corante, um tubo PE-10 cheio aos ~82 cm proximais à seringa com o mesmo corante e cheio nos 16 cm distais com o líquido de infusão, tendo na extremidade a cânula de infusão, sendo os dois meios líquidos separados por uma fase gasosa, a bolha de ar.

3.2.3.2 Infusão de ouabaína i.c.v.

Cada animal foi gentilmente imobilizado manualmente e com pinças de ponta fina teve removido do capacete o lacre de cola de poliestireno e o mandril. Em lugar deste último, introduziu-se na cânula guia a cânula de infusão cuidando para que esta fosse introduzida completamente. O animal foi posto ao centro de um campo aberto de acrílico transparente, aguardando-se no mínimo 5 minutos de ambientação. Após isto, iniciou-se a infusão dos 5 µL ao longo de 1 minuto, deixando no local a cânula de infusão por 1 minuto adicional para aguardar que o VL acomodasse o injetato evitando o refluxo deste. Junto com o início da infusão *i.c.v.* iniciou-se a gravação de um vídeo de 1 h em mídia digital a fim de colher dados comportamentais. Após 1 h os animmais foram eutanasiados por decapitação e as áreas cerebrais objetivadas (córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo) foram removidas para análise neuroquímica.

3.3 Desenho experimental

Inicialmente foi feito um estudo piloto com ratos Wistar machos de 250 a 350 g de massa corporal a fim de tatear a dose de ouabaína que diluída no volume fixo de 5 µL de ACSF fosse capaz de produzir um *endpoint* de crises generalizadas clônico-tônicas em aproximadamente 100% dos animais. Foram testadas as doses de 2,923 µg; 9,74 µg; 29,23 µg e 50 µg de ouabaína por animal em grupos de 5-7 animais. A dose de ouabaína selecionada nos grupos teste foi a de 29,23 µg por animal diluídos no volume fixo de 5 µL de (ACSF + O), pois nas doses menores uma baixa porcentagem dos animais desenvolveram o *endpoint* convulsivo, enquanto que na dose 50 µg a porcentagem de animais com o mesmo *endpoint* não diferiu significativamente de 29,23 µg.

Quanto aos animais, alocaram-se aqueles de 250-300 g preferencialemnte no grupo no grupo ACSF + O devido à observação de que o desenvolvimento de formas não generalizadas de crise ("*status* límbico-prosencefálico") ou comportamento incaracterístico (ex.: "*circling*") foi mais frequente em animais com massa corporal >300 g. Animais com massa corporal >300 ≤ 350 g foram, por isso, alocados no grupo ACSF, cujo número de indivíduos foi completado

com animais de massa 250-300 g até o *n* adequado. Foram colhidos dados de comportamento (vídeo) bem como espécimes de tecido para avaliação neuroquímica (estresses oxidativo e nitrosativo) ou para avaliação histopatológica da acurácia do implante da cânula guia, no caso do projeto piloto.

3.4 Eutanásia, remoção dos encéfalos, dissecção das áreas cerebrais e destino das carcaças

Após terem seu comportamento gravado em vídeo em meio digital por 1 hora, os animais foram eutanasiados por decapitação conforme a Resolução 1000/2012 do CFMV. Os encéfalos foram rapidamente removidos e as áreas cerebrais de interesse (córtex pré-frontal (C), hipocampo (H), corpo estriado (E), tálamo (T) e mesencéfalo (M)) foram rapidamente dissecadas sobre uma folha de alumínio mantida sobre gelo. As áreas foram recolhidas em eppendorfs marcados previamente com o número do animal e do grupo e armazenadas em freezer -80 ºC até a realização dos testes neuroquímicos. Estas áreas foram escolhidas com base em seus papeis na função do SNC.

O córtex pré-frontal é uma porção do córtex frontal (pré-motor), inclui o córtex ventromedial e possui extensas conexões com estruturas límbicas, sendo representativo do córtex, que está envolvido as crises generalizadas (KIM et al., 2013; LIMA et al., 2015). O hipocampo é uma área de baixo limiar epiléptico implicada direta ou indiretamente em crises epilépticas e epilepsias de diversos tipos (particularmente a ELT) e em seus modelos; contém populações celulares particularmente sensíveis a excitotoxicidade e a remodelamento, estando ainda relacionado a processos cognitivos (CHI et al., 2008; DE FREITAS et al., 2010; MA et al., 2012; FILHO et al., 2015; HAMELIN, DEPAULIS, 2015). O corpo estriado possui extensas conexões com os núcleos da base e com o córtex frontal sendo importante no controle da motricidade (DUNNETT, MELDRUM, MUIR, 2005). O tálamo é importante na propagação da atividade epileptiforme focal para áreas distantes e, portanto, é uma estrura chave na fisiopatogênese das crises epilépticas generalizadas (informação verbal)[7]. O mesencéfalo é uma estrutura do tronco cerebral que contém o colículo inferior, que, por sua vez, é o ponto de origem da atividade epileptiforme nas crises procursivas em diversos modelos (FAINGOLD, 2012).

[7] Informação verbal: Esper A. Cavalheiro, M.D., M.Sc. Ph.D., na 9th Latin-American Summer School on Epilepsy, São Paulo, 25/02/2015.

Os animais do projeto piloto tiveram os encéfalos fixados em formalina a 10% por 18 a 24 h e após isto em álcool 70 ºGL e então submetidos a processamento histopatológico de rotina para avaliação anatomopatológica (macroscópica) e histopatológica (microscopia de luz comum com coloração por hematoxilina-eosina) da acurácia da implantação da cânula guia no VL.

Todas as carcaças foram envolvidas em jornais, acondicionadas em sacos plásticos brancos leitosos para lixo biológico e depositadas em freezer destinado para este fim no Departamento de Fisiologia e Farmacologia, de onde se destinaram a incineração.

3.5 Análise comportamental das crises epilépticas *in vivo*

Após no mínimo 5 minutos de aclimatação dos animais em campo aberto de acrílico, ao mesmo tempo do início da infusão *i.c.v.*, foram iniciadas as tomadas de vídeo digital para registro do comportamento irrestrito dos animais. Os vídeos foram ulteriormente revisados para pesquisar e registrar os comportamentos com base em repertórios etológicos conhecidos (VELIŠKOVÁ, 2006). Os comportamentos exibidos, junto com os tempos de início e de término respectivos, foram registrados em tabela no programa Windows Excell 2013.

Após o projeto piloto, estabeleceram se os critérios de inclusão e de exclusão para escopo de análise comportamental. O critério de inclusão adotado foi a presença de uma convulsão procursiva (P1) em tempo ≤120 segundos, precedida de estadios de Racine ≤2. O critério de exclusão adotado foi a presença de estadio de Racine >2 em tempo ≤120 segundos (i.e. Racine 3 precoce) e/ou a ausência de crise P1 em ≤120 segundos. Este *endpoint* correlacionou-se com o desenvolvimento de crise epiléptica convulsiva generalizada tipo clônica com perda de RE em 100% os animais estudados.

Os parâmetros comportamentais pesquisados foram: latência e duração da 1ª convulsão procursiva (P1), latência e duração do *freezing* (F), latência e duração da 2ª convulsão procursiva (P2), latência da perda de reflexo de endireitamento (PRE), latência da 1ª convulsão clônico-tônica generalizada máxima ($CTG_{máx}$) e latência de morte (M) (Tabela 15). Os tempos de latência se abreviam por “L” e os de duração por “D”.

Ademais, registraram-se as alterações comportamentais que precederam P1, o número de recuperações do reflexo de endireitamento, quando as houve, e o número de $CTG_{máx}$ quando mais de uma (estes, não representados aqui), além da latência do clono límbico (estadio de Racine ≥3, (R3) tardio, i.e. latência ≥120 s) (Tabela 14), sendo as incidências expressas em

número absoluto e em porcentagem. Dentre várias escalas apresentadas em Velíšková 2006, a de Jobe e colaboradores (1973) para convulsões generalizadas com origem no tronco encefálico (Tabela 13), que representa melhor os comportamentos motores exibidos pelos animais.

Tabela 13. Estadiamento de crise convulsiva generalizada com origem em tronco encefálico (escala de Jobe)

Estadio	Comportamento	Estrutura envolvida
0	Sem resposta	**Tronco encefálico**
1	*Wild running seizure* (WRS), (focal)	
2	Dois WRS separados por um período refratário, clono envolvendo membros anteriores, posteriores, vibrissas ou pinas	
3	Um WRS sem período refratário, endpoint convulsivo como em 2	
4	Dois WRS separados por um período refratário, flexão tônica do pescoço, tronco e membros anteriores com clono dos membros posteriores	
5	Um WRS sem período refratário, endpoint convulsivo como em 4	
6	Dois WRS separados por um período refratário, endpoint convulsivo semelhante a 4, mas com extensão tônica parcial dos membros posteriores (extensão tônica das coxas e pernas, clono dos pés)	
7	Um WRS sem período refratário, endpoint convulsivo como em 6	
8	Dois WRS separados por um período refratário, endpoint convulsivo como em 4, mas com extensão tônica completa dos membros posteriores (=Convulsão generalizada máxima, $CTG_{máx}$)	
9	Um WRS sem período refratário, endpoint convulsive como em 8	

Fonte: Jobe Chin Lincoln (1973); Velíšková (2006)

Tabela 14. Estadiamento de crise convulsiva generalizada com origem límbica (escala de Racine modificada por Pinel e Rovner)

Estadio	Comportamento	Estrutura envolvida
1	Automatismos oroalimentares e faciais	Límbica (amígdala + hipocampo)
2	*Head nodding* (assentir com o segmento cefálico)	
3	Clono de membro anterior contralateral	Prosencéfalo extra-límbico
4	Clono de membro anterior bilateral	
5	*Rearing* (empinada em postura bípede sem tocar as paredes com os membros anteriores) + queda	
6*	*Wild running seizure* (WRS) + *Jumping seizure* (JS) + vocalização	Tronco encefálico
7*	Postura tônica	
8*	Crise convulsiva espontânea	

modificações feitas por Pinel e Rovner (1978) (*)
Fonte: Velíšková (2006)

3.6 Análise neuroquímica: estresses oxidativo e nitrosativo

3.6.1 Estresse oxidativo - Estimação da peroxidação lipídica pela concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado tálamo e mesencéfalo

A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) através de técnica descrita por Draper e Hadley (1990) foi usada para determinar os níveis de peroxidação lipídica em hipocampo, corpo estriado, córtex frontal. Os homogenatos de cada área cerebral a 10% (p/v) em tampão de Na_3PO_4 a 50 Mm, pH 7,4 foram acrescidos de 500 µL de ácido tricloroacético a 10 % e 500 µL de ácido tiobarbitúrico a 0,67 % e levados a banho-maria a 37 °C por 60 minutos. Findo esse tempo, foram adicionados de 500 µL de n-butanol e centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos. Enfim, a fase butanólica teve sua absorbância lida espectrofotometrocamente a 535 nm (faixa de luz visível). Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído (MDA)/grama de homogenato.

3.6.2 Estresse oxidativo – Medida da concentração de glutationa reduzida (GSH) em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo

A reação de Ellman, executada conforme descrita por Sedlak e Lindsay (1968) foi usada na estimação do conteúdo de glutationa reduzida (GSH) nas áreas cerebrais. Os homogenatos de cada área cerebral a 10% (p/v) em EDTA 0,02 M foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. 400 µL de sobrenadante foram coletados e acrescidos de 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e 20 µL de ácido 2-nitrobenzóico a 0,01 M (DTNB, reagente de Ellman). Após 1 minuto, foi realizada a leitura espectrofotométrica da absorbância a 412 nm. Resultados foram expressos em U/µg de proteína.

3.6.3 Estresse nitrosativo - Medida da concentração de nitrito (NO_2^-) em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo

A reação de Griess, executada conforme técnica descrita por Green et al. (1982) foi empregada na estimação do conteúdo de nitrito (NO_2^-) nos homogenatos. Uma alíquota de 500 µL de homogenato de cada área cerebral a 10% (p/v) em tampão de Na_3PO_4 a 50 Mm, pH 7,4 foi misturada a 500 µL do reagente de Griess (sulfanilamida 1%, H_3PO_4 1%, cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina a 0,1% em água destilada 1:1:1:1, v/v/v/v) em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foi lida a absorbância espectrofotométrica a 550 nm. Resultados foram expressos em µM.

3.7 Análise estatística dos dados

Nos grupos de animais cujos encéfalos foram submetidos a avaliação histopatológica, a acurácia da implantação das cânulas guia no VL direito foi expressa como porcentagem de acerto.

Os dados sobre comportamento compilados foram transladados para o programa Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, EUA), submetidos a estatística descritiva de coluna, expressos como média ± erro padrão da média (M ± EPM), sendo a seguir submetidos a teste de bondade do ajuste à normalidade (de Shapiro-Wilk) e a teste de regressão linear (de Pearson).

Os testes de neuroquímica (estresses oxidativo e nitrosativo) nas áreas de intresse tiveram seus valores compilados em tabela no Windows Excell 2013, transladados para o programa Prism 6, submetidos a estatística descritiva, sendo expressos como M ± EPM, e a seguir foram submetidos a teste de bondade do ajuste à normalidade (de Shapiro-Wilk) e a teste T paramétrico bicaudal (grupos teste, com ouabaína (ACSF + O) versus controle com ACSF sozinho (ACSF)) para grupos que passaram no teste de normalidade, ou a teste não paramétrico (de Mann-Whitney) bicaudal quando pelo menos um dos grupos não passou no teste de normalidade. O nível de significância $p<0,05$ foi usado em todos os casos.

3. RESULTADOS

4.1 Etologia das crises epilépticas por ouabaína *i.c.v.*

Tabela 15. Incidências e tempos de latência e de duração dos comportamentos motores no *status epilepticus* convulsivo por ouabaína *i.c.v.*

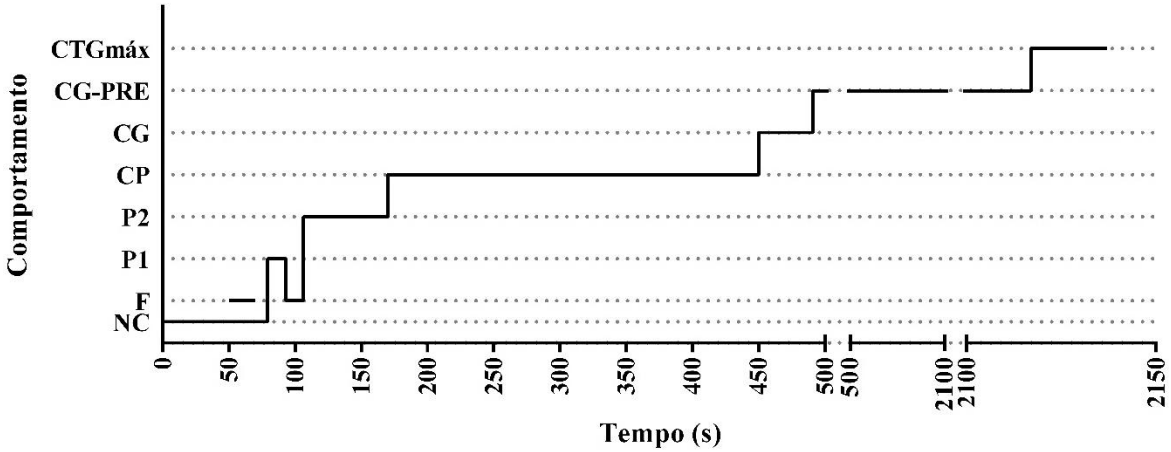
Comportamento	Incidência (*n* - %)	Latência (L) ou Duração (D)	Tempo (s) (média ± EPM)	*p* (SW)
P1	9 - 100%	L	79,33 ± 8,243	*
		D	14,33 ±1,818	*
F	9 - 100%	D	106,1 ± 44,25	*
P2	7 - 77,77%	L	169,6 ± 55,38	>0,05
		D	17,00 ± 2,545	>0,05
R3	4 - 44,44%	L	277,8 ± 77,56	>0,05
PRE	9 - 100%	L	491,2 ± 55,56	*
1CTG$_{máx}$	6 - 66,66%	L	2117 ± 166,3	>0,05
M	5 - 55,55%	L	2755 ± 83,77	>0,05

1ª convulsão procursiva (P1); *freezing* (F); 2ª convulsão procursiva (P2); convulsão clônica de membros anteriores estadio 3 de Racine tardio (R3); perda do reflexo de endireitamento (PRE); 1ª convulsão clônico-tônica generalizada máxima (1CTG$_{máx}$); morte (M); latência (L); duração (D); número de animais (*n*), porcentagem de animais (%) que apresentaram um dado comportamento; erro padrão da média (EPM); segundos (s); valor de *p* no teste de bondade do ajuste segundo Shapiro-Wilk (*p* (SW)); valor de $p<0,05$ (*) para uma amostra de 9 animais que atenderam aos critérios de inclusão durante o tempo total analisado de 1 hora.

O padrão comportamental exibido pela maioria (~85%) dos animais que recebem 29,23 µg de ouabaína dissolvida em 5 µL de ACSF intracerebroventricularmente consta de uma fase de alterações comportamentais representadas por *hipergrooming*, *sniffing* (i.e. fungor) excessivo, marcha ou postura com ataxia dos membros posteriores, *freezing* ou *motionless staring* (F) (i.e. parada do comportamento e imobilidade) com *whiplike tail movement* (movimento de chicoteio da cauda), hiperventilação, ereção da cauda (cauda de Straub (CS)) e comportamentos como *twitching* das vibrissas, automatismos oroalimentares e faciais (estadio 1 de Racine, Tabela 14) e *head nodding* (HN) (i.e. movimento de assentir com o segmento cefálico, estadio 2 de Racine, Tabela 14) em uma combinação variável, seguidos de uma a três (usualmente duas) crises epilépticas convulsivas de tipo procursivo ("*wild running seizure*" (WRS) + "*jumping seizure*" (JS) ± vocalização, i.e. *endpoint* 2 de Jobe, Tabela 13) denotadas por procursiva 1 (P1) e procursiva 2 (P2) intercaladas por um período de imoblidade (F) com chicoteio da cauda usual, seguidas de crises convulsivas tipo clônica parcial (CP) (i.e. que não envolvem os quatro membros, usualmente envolvendo os membros anteriores bilateralmente, como no clono límbico dos estadios 3-4 de Racine, Tabela 14) gradualmente substituídas por clônicas generalizadas (CG) (i.e. que envolvem os quatro membros, com perda do reflexo de

enrdireitamento (PRE)) que evoluem em *status epilepticus* clônico com fenômenos tônicos tardios mais aparentes na musculatura axial, regularmente sucedido de uma ou mais convulsões clônico-tônicas generalizadas máximas ($CTG_{máx}$) (i.e.: clono generalizado + opistótono + CS + flexão do segmento cefálico + extensão dos membros anteriores + extensão tônica máxima dos membros posteriores, estadio 8 de Jobe, Tabela 13) terminando com depressão pós-ictal durante a qual usualmente se verifica parada respiratória reversível ou não. Caso haja recuperação, o animal reassume a sequência de comportamentos a partir do clono generalizado (Tabela 15, Figura 7).

Figura 7. Etograma do *status epilepticus* convulsivo por ouabaína *i.c.v.*



Comportamento não convulsivo (NC); 1ª convulsão procursiva (P1); *freezing* (F); 2ª convulsão procursiva (P2); clono parcial (inclui Racine 3) (CP); clono generalizado (CG); clono generalizado com perda do reflexo de endireitamanto (CG-PRE); convulsão clônico-tônica generalizada máxima ($CTG_{máx}$); médias de 9 animais.

Em cerca ~12% dos animais os sinais não convulsivos citados acima (*hipergrooming*, *sniffing*, ataxia e estadios ≤2 de Racine, Tabela 14), incluídos no período de latência, se seguiram precocemente de comportamento motor convulsivo tipo clono bilateral de membros anteriores em postura bípede com flexão do tronco (clono límbico, estadio 3-4 de Racine, Tabela 14) e depois *rearing* (i.e. movimento de empinar-se, elevar as patas anteriores em postura bípede sem tocar as paredes da caixa, estadio 5 de Racine, Tabela 14) que se amiudava até uma postura bípede constante. Mantendo o comportamento de clono de membros anteriores e a postura bípede, estes animais evoluíram com *wet dog shakes* (WDS) (i.e. sacudidela tipo "cão molhado") consistentes e *whole body twitches* (WBT) ocasionais (i.e. sacudidela tipo *startle* ou sobressalto de corpo inteiro, um tipo breve de convulsão clônica). O resultado final foi um *status epilepticus* composto de clono de membros anteriores e automatismos oroalimentares em postura bípede de base alargada semifletida ou totalemnte ereta, sem perda

do RE, sem evolução para estadios mais avançados, condição que propomos chamar de "*status* límbico-prosencefálico"

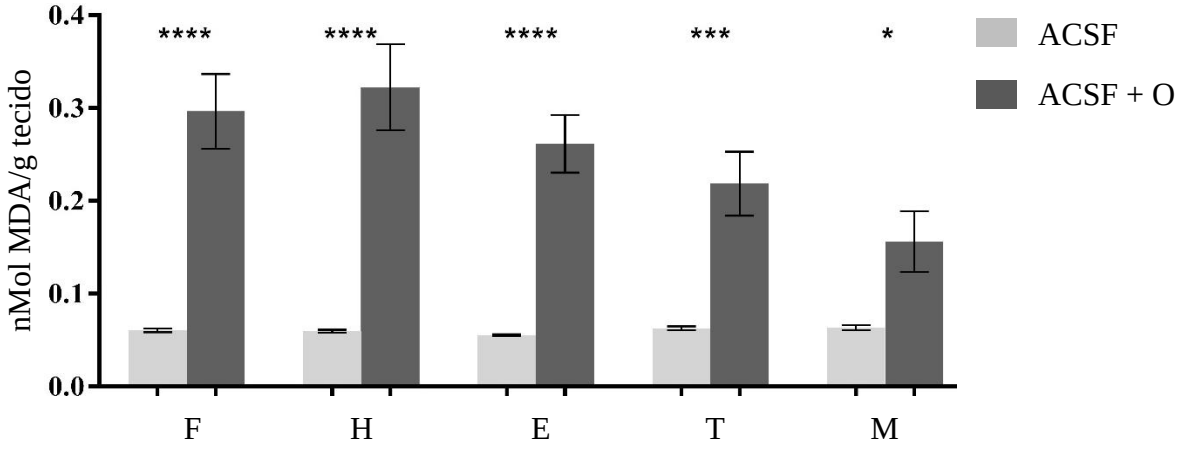
Em <3% dos animais não houve comportamento motor convulsivo bem definido. Estes comportamentos "não convulsivos" foram: tipo "*circling*" no sentido horário (=*clockwise gyration*) ou no sentido anti-horário (=*anti-clockwise gyration*), marcha atáxica, fracionada, incoordenação motora, repouso sobre o ventre, perda do RE sem clono generalizado consistente ou ainda hiperatividade locomotora.

4.2 Estresses oxidativo e nitrosativo

4.2.1 Efeito da ouabaína *i.c.v.* na lipoperoxidação em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo

Os níveis de lipoperoxidação medidos em nanomol de dialdeído malônico por grama de tecido (nMol MDA/g) expressos como média ± erro padrão da média (EPM) dos grupos controle (ACSF) e teste (ACSF + O), respectivamente, para as áreas córtex pré-frontal (C), hipocampo (H), corpo estriado (E), tálamo (T) e mesencéfalo (M) foram: C) 0,06053 ± 0,001954 e 0,2964 ± 0,04011, p<0,0001; H) 0,0596 ± 0,001603 e 0,3222 ± 0,04625, p<0,0001; E) 0,05553 ± 0,001073 e 0,2613 ± 0,03127, p<0,0001; T) 0,06267 ± 0,002137 e 0,2184 ± 0,03446, p<0,001; M) 0,0634 ± 0,002810 e 0,1559 ± 0,03282, p<0,01 para n = 12 por grupo (Figura 8).

Figura 8 – Níveis de lipoperoxidação em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo dos grupos controle e teste



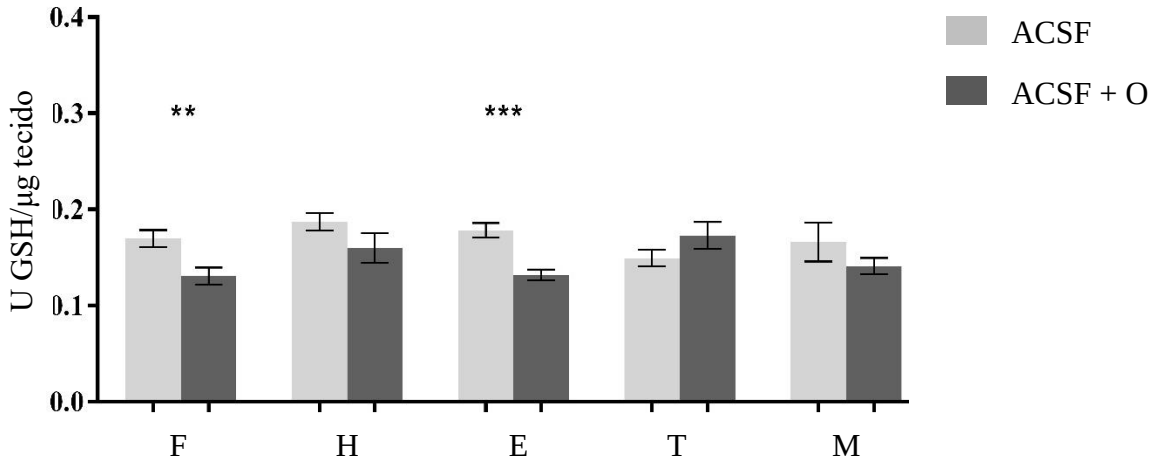
Níveis de lipoperoxidação medidos em nanomol de dialdeído malônico por grama de tecido (nMol MDA/g tecido) expressos como média ± erro padrão da média (EPM) dos grupos controle (ACSF) e teste (ACSF + O) nas áreas córtex pré-frontal (F), hipocampo (H), corpo estriado (E), tálamo (T) e mesencéfalo (M). p<0,05 (*); p<0,01 (**); p<0,001 (***); p<0,0001 (****); n = 12 por grupo. Teste T paramétrico bicaudal.

Adicionalmente, os níveis de TBARS não diferiram entre as cinco áreas dentro do grupo ACSF (dado não mostrado), mas foram significativamente maiores (p<0,05) em H que em T no grupo ACSF + O ao teste de ANOVA de duas vias seguido de Tukey como teste *post-hoc*, não havendo diferença significativa entre as demais áreas no grupo ACSF + O (dado não mostrado).

4.2.2 Efeito da ouabaína *i.c.v.* na concentração de glutationa em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo

As concentrações de glutationa medida em Unidades por micrograma de proteína (U/μg) expressos como média ± erro padrão da média (EPM) dos grupos controle (ACSF) e teste (ACSF + O), respectivamente, para as áreas córtex pré-frontal (C), hipocampo (H), corpo estriado (E), tálamo (T) e mesencéfalo (M) foram: C) 0,1696 ± 0,008920 e 0,1306 ± 0,008798, p<0,01; H) 0,1869 ± 0,009240 e 0,1599 ± 0,01530, p>0,05; E) 0,1781 ± 0,007686 e 0,1320 ± 0,005509, p<0,0001; T) 0,1493 ± 0,008578 e 0,1729 ± 0,01379, p>0,05; M) 0,1661 ± 0,02038 e 0,1409 ± 0,008436, p>0,05. n = 12 por grupo (Figura 9).

Figura 9 – Concentração de glutationa em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo dos grupos controle e teste

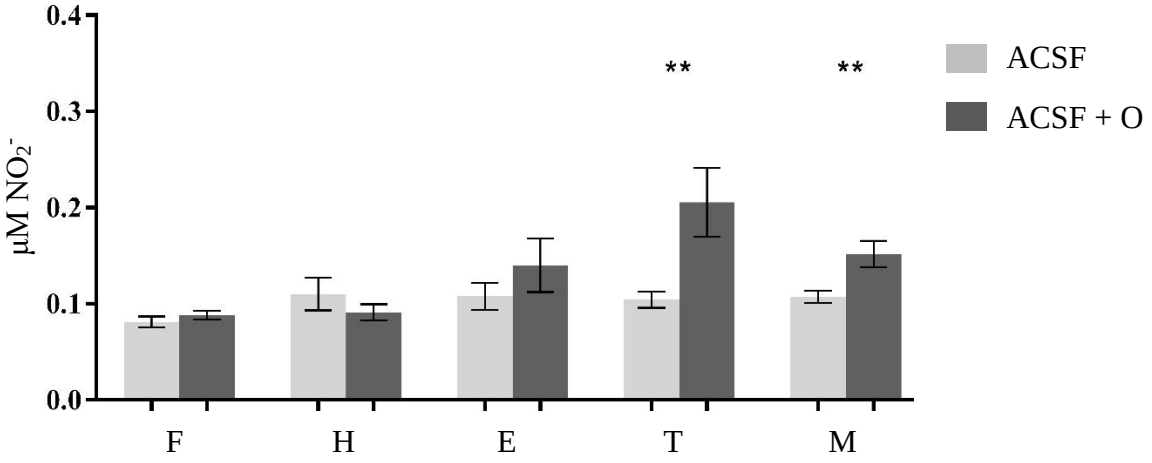


Concentração de glutationa medida em Unidades por micrograma de proteína (U/μg) expressos como média ± erro padrão da média (EPM) dos grupos controle (ACSF) e teste (ACSF + O), nas áreas córtex pré-frontal (F), hipocampo (H), corpo estriado (E), tálamo (T) e mesencéfalo (M). p<0,01 (**); p<0,0001 (****); n = 12 por grupo. Teste T paramétrico bicaudal.

4.2.3 Efeito da ouabaína *i.c.v.* na concentração de nitrito em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo

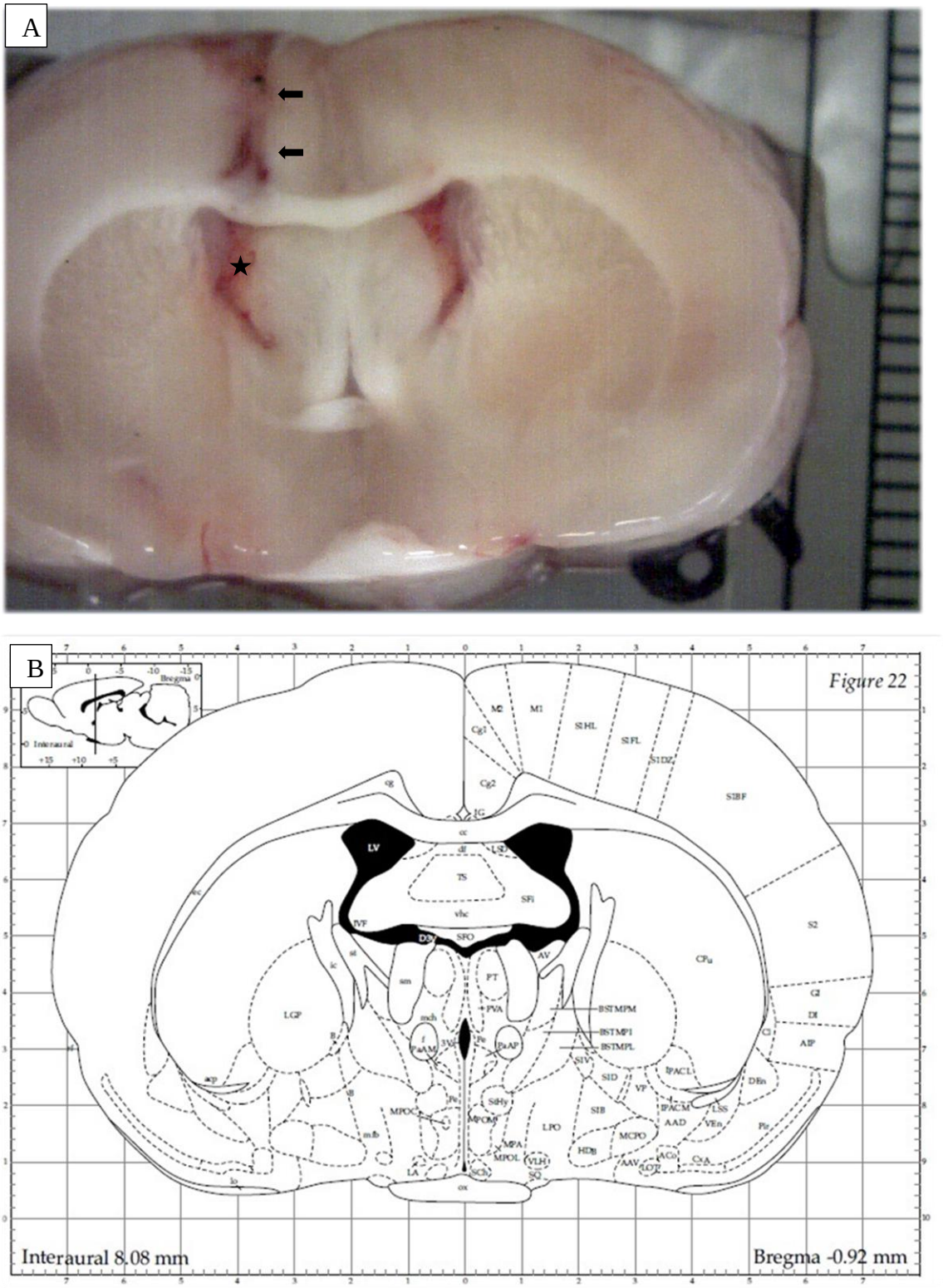
As concentrações de nitrito [NO_2^-] medida em micromolares (µM NO_2^-) expressos como média ± erro padrão da média (EPM) dos grupos controle (ACSF) e teste (ACSF + O), respectivamente, nas áreas córtex pré-frontal (C), hipocampo (H), corpo estriado (E), tálamo (T) e mesencéfalo (M) foram: C) 0,08109 ± 0,005715 e 0,08809 ± 0,004621, p>0,05; H) 0,1103 ± 0,01703 e 0,0910 ± 0,008449, p>0,05; E) 0,1078 ± 0,01392 e 0,1400 ± 0,02789, p>0,05; T) 0,1043 ± 0,008600 e 0,2054 ± 0,03602, p>0,01; M) 0,1073 ± 0,006554 e 0,1517 ± 0,01370, p>0,01, para n = 12 por grupo. Teste de Mann-Whitney de duas vias (Figura 10).

Figura 10 – Concentração de nitrito em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado, tálamo e mesencéfalo dos grupos controle e teste



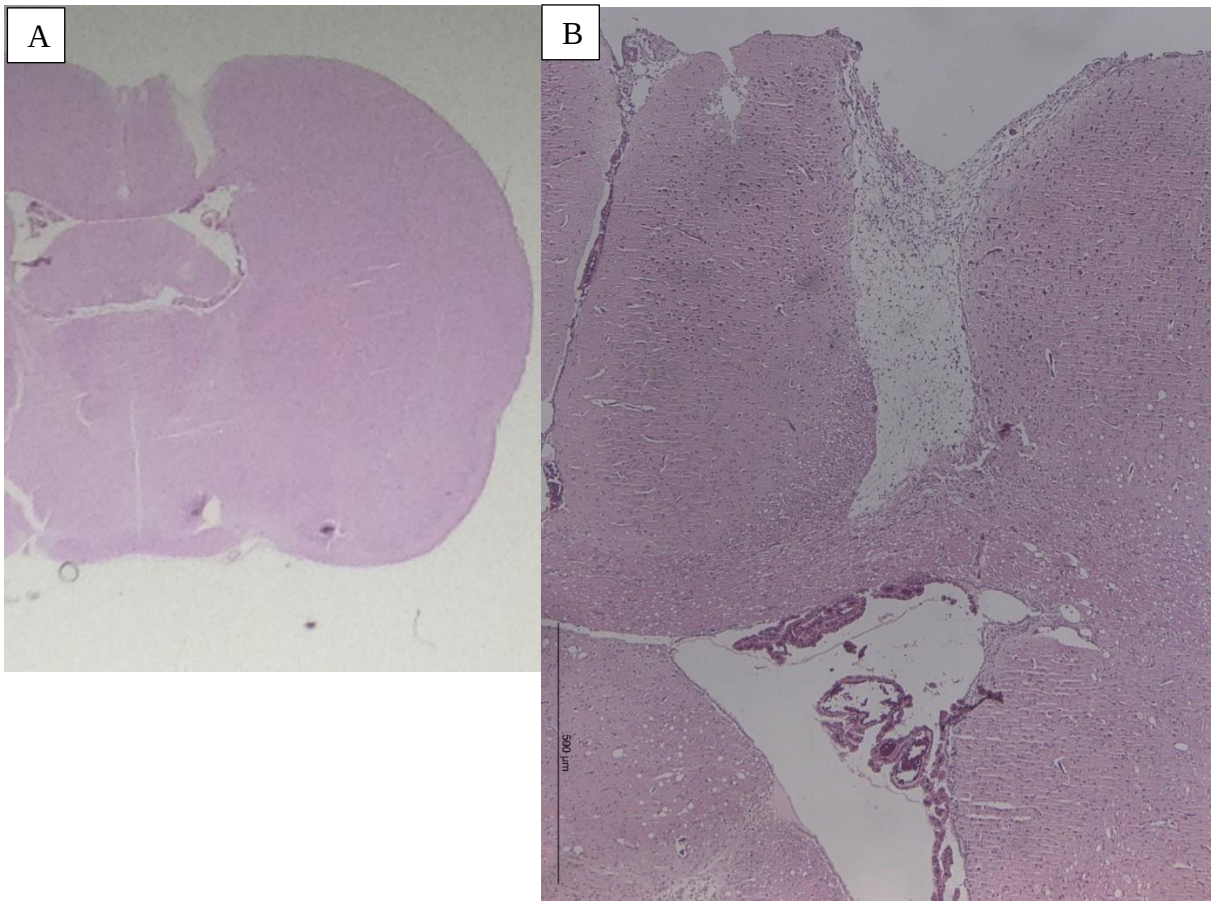
Concentração de nitrito medida em miclomolares (µM NO_2^-) expressos como média ± erro padrão da média (EPM) dos grupos controle (ACSF) e teste (ACSF + O), nas áreas córtex pré-frontal (A), hipocampo (B), corpo estriado (C), tálamo (D) e mesencéfalo (E). p<0,05 (*); p<0,01 (**); n = 12 por grupo. Teste de Mann-Whitney de duas vias.

Figura 11 – Corte coronal de cérebro de rato a fresco 0,9 mm caudal ao Bregma mostrando o tracto da cânula para ventrículo lateral



A) Corte coronal a fresco de cérebro de rato ~0,9 mm caudal ao Bregma tomado sob lupa estereoscópica após injeção *i.c.v.* evidenciando o tracto da cânula-guia (setas) para o ventrículo lateral e discreta hemorragia do plexo coróideo do ventrículo lateral direito (asterisco); escala graduada em milímetros à direita. B) Prancha estereotáxica coronal ~0,9 mm caudal ao Bregma, para comparação.

Figura 12 - Lâmina histológica de corte coronal de cérebro de rato 0,9 mm caudal ao bregma corado por HE mostrando o tracto da cânula para o ventrículo lateral



Lâmina histológica de corte coronal ~0,9 mm caudal a bregma em animal no qual foi implantada a cânula-guia, não usado para injeção com a cânula de infusão. A) Imagem panorâmica do encéfalo. B) Detalhe em pequeno aumento (100 x) evidenciando o tracto da cânula-guia parando próximo às fibras calosais, ~0,5 mm acima do teto do ventrículo lateral; observam-se gliose e macrófagos contendo hemossiderina na parte superior da figura.

5. DISCUSÃO

O padrão comportamental das crises epilépticas induzidas por ouabaína *i.c.v.* (Tabela 15, Figura 7) é compatível com uma ictogênese primária multifocal em regiões límbica (automatismos oroalimentares e movimento de assentir com o segmento cefálico, estadios 1-2 de Racine, Tabela 14), e do tronco encefálico (crises procursivas P1 e P2, estadios de Jobe, Tabela 13) evoluindo como uma crise clônica generalizada e *SE*.

De fato, o hipocampo, uma área límbica, forma grande parte do aspecto posterior da parede inferior do VL e certamente é um local de primeiro contato da ouabaína. Também o corpo estriado forma grande parte da parede inferior do VL; no entanto ele é uma érea de limiar convulsivo relativamente alto, um improvável sítio de ictogênese, sendo mais provavelmente implicado nos sinais de ataxia observados.

Recentemente as estruturas subcorticias tem sido reconhecidas como sítio ictogênico clinicamente importante (BERG et al., 2010; VINOGRADOVA, 2015; VINOGRADOVA, GRINENKO, 2016) apesar de isto ter sido demonstrado anteriormente em animais (JOBE, CHIN, LINCOLN, 1973) e de certo modo já prenunciado na teoria "centrencefálica" de Penfield e Jasper nos anos 1950 (FAINGOLD, 2012).

Em linha com isto, estudos baseados em bloqueio, estimulação e registro neuronal revelaram que o colículo inferior (IC) é o local consensual de iniciação das crises epilépticas em todos os modelos audiogênicos e tem sido implicada como fisiopatologia das crises procursivas nestes modelos, incluindo camundongos DBA/2, as cepas de ratos GERP-9 e GERP-3 (DORETTO; GARCIA-CAIRASCO, 1995; DUTRA MORAES, GALVIS-ALONSO; GARCIA-CAIRASCO, 2000; VINOGRADOVA, 2015; VINOGRADOVA; GRINENKO, 2016; POLETAEVA et al., 2015), hamsters (CARBALLOSA-GONZALEZ et al., 2013; MUÑOZ et al., 2016; PRIETO-MARTÍN et al., 2015), em animais com hipotireoidismo e crises por retirada de etanol (FAINGOLD, 2012). O GABA é responsável, no colículo inferior, por mediar várias formas de inibição evocada por estímulo acústico, incluindo redução do disparo normalmente induzido por estímulo acústico de alta intensidade. A estimulação direta do colículo inferior resencadeia susceptibilidade a convulsões audiogênicas em animais normais não susceptíveis. Diversas formas de inibição GABAérgicas estão comprometidas nos ratos GERP-9, o que se relaciona com uma redução de 80% de expressão da subunidade γ2 do receptor $GABA_A$ difusamente no cérebro destes animais.

É muito provável que o colículo inferior seja o sítio de ictogênese focal do tronco encefálico na fase procursiva também no modelo da ouabaína; no entanto confirmar isto exigiria

estudos de hibridização para *c*-FOS (um marcador precoce de hiperexcitação) ou captação de 2-deoxifluorglicose, técnicas de eletrofisiologia com implantação estereotáxica de múltiplos eletrodos subcorticais ou ainda bloqueio por injeção estereotáxica de muscimol, por exemplo.

A via pela qual a atividade ictal primária do colículo inferior se propaga para o prosencéfalo foi bem documentada nos modelos audiogênicos e envolve corpo geniculado medial e campo retrorubral[8] e suas projeções para amígdala e *accumbens* (FAINGOLD, 2012). Entretanto a(s) via(s) pela(s) qual(is) a atividade epileptiforme primária hipocampal faz o caminho inverso (i.e. hipocampo → colículo inferior) no modelo da ouabaína *i.c.v.* é difícil de elucidar sem experimentos ecpecíficos para este fim. Uma hipótese alternativa seria a ativação do colículo inferior independente da do hipocampo, quando a ouabaína atinge estruturas do terceiro ventrículo ou a substância cinzenta periaquedutal. De todos os modos, fica evidente que a ictogênese neste modelo é multifocal, corroborando com dados da literatura para a via *i.c.v.* (VELÍSEK, 2006).

As crises epilépticas parciais de tipo procursivo tem sido descritas em humanos desde o século XIX (COURTNEY, 1906; STEVENSON, 1931; BARREIRA, LISON, SPECIALI, 1982). Se bem que a literatura não estabeleça o substrato anátomo-patológico das crises procursivas em humanos, foi-lhes atribuído um valor lateralizatório na ELT (JIN, INOUE, 2009).

A estimulação direta do tronco cerebral e da medula espinal pode induzir atividade muscular tônica semelhante ao componente tônico das convulsões tônico-clônicas generalizadas (TCGs). Ademais, os movimentos de clono coordenado estereotipado dos quatro membros (clono generalizado) visto nas TCGs tem sido atribuídos ao recrutamento das vias motoras responsáveis pelo movimento normal na rede atingida pela atividade ictal, a saber *substantia nigra*, substância cinzenta periaquedutal e formação reticular (FAINGOLD, 2012).

Os altos níveis de lipoperoxidação encontrados em todas as áreas nos aniamis do grupo teste (ACSF + O) são compatíveis com hiperexcitabilidade e refletem uma atividade ictal generalizada, tendo atingido menor magnitude em áreas de tronco encefálico (T, $p<0,001$ e M, $p<0,01$) que em áreas mais rostrais (C, E, H, $p<0,0001$), embora não haja diferença significativa entre as áreas dentro do grupo tratado.

A concentração de glutationa esteve significativamente reduzida em C e E nos aniamis do grupo teste (ACSF + O). Neste último, o consumo de GSH pode refletir a alta concentração de Fe^{+2} nesta região (ZALESKA, FLOYD, 1985), o qual é catalizador na reação de Fenton,

[8] Comunicação informal feita por: Carlos de Cabo de la Vega, Ph.D., em 27/09/2016

promovendo a produção de raical hidroxil a partir do peróxido de hidrogênio (VALKO et al., 2007).

Os efeitos do NO sobre as crises epilépticas são intrincados e de difícil interpretação. A ação do NO varia entre pró- e anticonvulsivante conforme o tipo de doador de NO (ou o tipo de antagonista de NOS) usado, sua dose e o modelo de crise epiléptica. Sumariamente, sabe-se que o NO tem efeito bifásico na liberação de GABA: níveis basais de NO mantém baixos níveis de GABA, enquanto que níveis umentados de NO aumentam a liberação deste neurotransmissor.

No presente trabalho, a concentração de nitrito, um catabólito de NO, esteve significativamente aumentada somente em áreas de tronco cerebral (T e M, $p<0,01$). Tal achado encontra um interessante paralelo no modelo de crises audiogênicas em hamsters GASH:Sal (PRIETO-MARTÍN et al., 2012). Estes autores encontraram um aumemto na atividade da NOS constitutiva somente em áreas de tronco crebral (mesencéfalo), mas não em áreas de prosencéfalo (corpo estriado, hipocampo, hipotálamo, córtex) nem em cerebelo ou em ponte-bulbo após as crises, o que foi confirmado pelo aumento da expressão de nNOS no mesencéfalo.

Os autores explicam o achado pelo fato de o mesencéfalo estar envolvido precocemente na atividade ictal naquele modelo, enquanto que áreas prosencefálicas seriam recrutadas mais tardiamente. Além disto, os autores atribuem o fato de tal achado não haver sido reproduzido em outros modelos ao uso de cérebro inteiro menos cerebelo por outros pesquisadores, ou ainda ao fato de que nos modelos por quimioconvulsivante sistêmico, este atinge o parênquima cerebral de forma mais ou menos simultânea e homogênea. Assim, os achados do presente trabalho corroboram com a literatura e apontam para um envolvimento precoce de estruturas mesencefálicas na atividade ictal.

No que tange o mecanismo molecular da atividade epileptiforme, sabe-se que a inibição de NKA com baixa afinidade pela dihidro-ouabaína causa aumento do acoplamento potencial pós-sináptico excitatório – despolarização em neurônios piramidais (VAILLEND, 2002). Ainda, a inibição de NKA de alta afinidade por ouabaína provoca uma corrente de entrada líquida (de sódio) (ANANTHALAKSHMI, EDAFIOGHO, KOMBIAN, 2006), gera oscilações de cálcio intracelular e altera a exocitose de vesículas de neurotransmissores. Sabe-se ainda que NKA chega a ter na repolarização um papel mais importante que os canais de potássio. Neste âmbito, a pós-hiperpolarização mediada pela bomba foi revelada como responsável por um "período refratário" capaz de prevenir o disparo prematuro e excessivo em neurônios piramidais

numa alça de retroalimentação. Tais mecanismos estão profundamente inibidos pela ouabaína em concentrações de ordem micromolar (GULLEDGE et al., 2013).

Pelo menos desde os anos 1970 tem sido relatada uma redução significativa da atividade de NKA em focos epilépticos em relação ao tecido não epiléptico circunjacente (DONALDSON et al., 1972) em paralelo com uma diminuição patológica da capacidade daqueles focos de tamponar elevações transitórias de $[K^+]_e$. Isto se associa a uma falha na defosforilação promovida por K^+ da subunidade α (BENARROCH, 2011).

Ademais, tem-se evidenciado que os transitórios de $[Na^+]_i$ astrocitários provcados pelo aumento da atividade dos EAATs induzido por glutamato é capaz de induzir um aumento na atividade de NKA o qual, por sua vez, é essencial para a captação do K^+_e por aquelas células durante atividade neuronal, evitando mais despolarização. Neste sentido, as diversas isoenzimas de NKA possuem papeis específicos. A isoforma astrocitária α2 possui baixa afinidade por Na^+, e sua $V_{máx}$ é atingida somente em valores altos de $[Na^+]_i$, de maneira que esta isoforma assume maior importância na repolarização (LARSEN, STOICA, MACAULAY, 2016; LARSEN et al., 2016), enquanto que α1 (constitutiva, ubíqua) tem afinidade por Na^+ relativamente alta e já se encontra saturada e operando à sua $V_{máx}$ em valores mais baixos de $[Na^+]_i$, sendo importante na manutenção do potencial de repouso. O mesmo se aplica às isoformas α3 (neuronal, de baixa afinidade) e α1 expressa em neurônios.

Na transmissão sináptica química, a recaptação da molécula do neurotransmissor é requerida para a terminação do estímulo. Exceções à regra são os transmissores gasosos, os peptídeos e a acetilcolina (ACh). Nestes casos, o sinal termina por difusão da molécula ou por sua associação a outra espécie química (ex.: o grupamento sulfidrílico do GSH) no caso do NO, ou ainda por hidrólise da molécula (caso da ACh). Quando se tratam de monoaminas e aminoácidos, a molécula é captada da fenda sináptica por simportadores dependentes de sódio, presentes nos processos astrocitários que circundam as sinapses ou, em menor grau, no terminal pré-sináptico (LEVINE et al., 2016).

A captação sináptica de monoaminas e aminoácidos é um processo de transporte ativo secundário que funciona às expensas da *f.e.m.*Na^+. Este processo, mediado pelos "transportadores de monoaminas " (*monoamine transporters* – MAT, que inclui DAT, NET e SERT, transportadores para dopamina, noradrenalina e 5-HT, respectivamente), requer a entrada de 1 Na^+ e a saída de 1 Cl^- para cada molécula de substrato (LEVINE et al., 2016). O transportador de GABA, GAT-1, opera de modo semelhante (RAVNA et al., 2008). Por outro lado, o transporte do glutamato é especialmente dependente da *f.e.m.*Na^+, pois a captação de

uma molécula do substrato se acopla ao simporte de 3 Na^+ e 1 H^+, bem como ao antiporte de 1 K^+ por ciclo (LEVINE et al., 2016; ZHOU et al., 2014; SHEEAN et al., 2013; MISHRA et al., 2013). Tenha-se em mente que a manutenção do gradiente (e da *f.e.m.*) de Na^+ é papel da NKA, que, para isto consome não menos que 50% do ATP total do sistema nervoso.

A sinalização glutamatérgica, responde por 80% do ATP consumido do SNC, majoritariamente devido a eventos pós-sinápticos; e ouabaína é capaz de praticamente abolir o aumento no consumo de ATP induzido por estimulação glutamatérgica (FOO, BLUMENTHAL, MAN, 2012). Com efeito, a sinalização glutamatérgica é a maior responsável pelos aumentos transitórios de $[Na^+]_i$ tanto em neurônios (através de receptores ionotrópicos de glutamato dos tipos AMPA, KA e NMDA e, indiretamente, pelos canais de sódio operados por voltagem) quanto em glia (através dos transportadores de aminoácidos excitatórios EAATS dos tipos GLAST e GLT-1). As sinalizações GABAérgica e monoaminérgica contribuem de maneira muito menor para transitórios de sódio (informação verbal)[9], seja por mecanismos de recaptação, seja pela sinalização pós e pré-sináptica.

De fato, isoformas α2 de NKA ocorrem em maior densidade em processos astrocitários, enquanto que α1 ocorre em maior quantidade no corpo destas células. Isoformas α2 foram encontradas nesta localização formando complexos moleclulares com transportadores de glutamato GLT-1 em estreita proximidade com mitocôndrias e *pools* de ATP (SHEEAN et al., 2013). Analogamente, complexos moleculares entre NKA e transportador de glicina Glyt2 foram encontrados em neurônios no SNC (DE JUAN-SANZ et al., 2013).

Ante o exposto, e considerando a deterioração da neurotransmissão GABAérgica (equilíbrio iônico do cloreto atingido após 1 segundo de ativação tônica do receptor $GABA_A$ (STALEY, 2015) e internalização do receptor, presente dentro de no máximo 30 minutos de crise epiléptica (DORANDEU et al., 2013; FANG, WANG, 2015; SYNOWIEC et al., 2013), o papel de propagação e de manutenção da atividade epileptiforme parece recair preponderantemente sobre o glutamato, ainda que não se possa afirmar o mesmo sobre a iniciação da atividade epileptiforme, e ainda que a confirmação da hipótese requeira métodos como análise de efluente de microdiálise ou avaliação da concentração de glutamato bem como da atividade dos EAATs (GLAST e GLT) em preparações sinaptossômicas. Dados em culturas astrocitárias e fatias de cérebro isolado apoiam esta visão (ROSE et al., 2009; MOREIRA et al., 2011).

[9] Informação verbal proferida em palestra de Pierre Magistretti, Ph.D. em Buenos Aires em outubro de 2016 durante o 2nd Federation of Latin American and Caribean Neuroscience Societies - FALAN

Em linha com isto, déficits na captação de glutamato e de K^{+}_{e} foram relatados na hemicrania hemiplégica familiar tipo 2(FHM-2) (CAPUANI et al., 2016), uma doença causada por mutação com perda de função da isoforma α2 (astrocitária) de NKA, enquanto despolarização em salvas foi relatada em células de Purkinge knockdown para α3 num modelo de distonia-parkinsonismo de início rápido (RDP) (FREMONT, TEWARI, KHODAKHAH, 2015).

Na atualidade, os trabalhos envolvendo o modelo da ouabaína *i.c.v.* tem enfocado a sinalização intracelular dependente do Ca^{+2}, como a proteinocinase ativada por mitógeno/ cinase regulada extracelularmente (MAP/ERK) e a fosfoinositídeo3 cinase/ proteinocinase B (PI3K/AKT) (KIM et al., 2008; YU et al., 2010; YAMAGATA et al., 2013; KIM et al., 2013; LOPES et al., 2015). Paralelamente, pesquisas recentes tem abordado NKA explicitamente como alvo farmacológico de estratégias antiepilépticas (DELLA-PACE et al., 2013; FUNCK et al., 2014; FUNCK et al., 2015). Nesse sentido, manipulações farmacológicas capazes de preservar a atividade de NKA em níveis fisiológicos tem tido efetividade antiepiléptica demonstrada.

O modelo de crises epilépticas por ouabaína *i.c.v.*, por ser extremamente laborioso e por haver alternativas mais custo- e tempo-efetivas com valor preditivo semelhante, dificilmente seria factível na triagem inicial em larga escala de candidatos a fármaco antiepiléptico. No entanto ele pode servir ao estudo de caracterização avançada de fármacos com atividade antiepiléptica previamente testada em outros modelos, ou ao estudo de mecanismos de ictogênese, bem como para o desenho e testagem de medidas que objetivem tais mecanismos. Ademais, por ser um modelo de crises epilépticas particularmente graves, ele pode ser proposto como modelo de *SE* farmacoresistente, sendo útil para ensaiar abordagens farmacológicas nestas situações.

6. CONCLUSÃO

No modelo de crises epilépticas por ouabaína *i.c.v.*, o comportamento é compatível com ictogênese multifocal em focos límbico e de tronco encefálico (provavelmente colículo inferior), enquanto que a neuroquímica aponta um dano oxidativo intenso e difuso nas membranas lipídicas associado a estresse nitrosativo em regiões caudais. Em linhas gerais, os achados estão acordo com a literatura. De acordo com evidências de outros estudos *in vitro*, fornece-se uma hipótese sobre o papel do glutamato na fisiopatologia do modelo que pode agregar-he valor enquanto construto teórico, ao lado de apontar para estratégias farmacológicas antiepilépticas alternativas às que já existem. Ademais, aportam-se amplas possibilidades para a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos através da implantação do protocolo de via de administração *i.c.v.* crônica, e evidencia-se a necessidade de estudos no intento de melhor caracterizar o modelo.

REFERÊNCIAS

(CONCEA), C. N. D. C. D. E. A. / M. D. C. T. E. I. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. **Vasa**, p. 1–50, 2013.

ANANTHALAKSHMI, K. V. V.; EDAFIOGHO, I. O.; KOMBIAN, S. B. Concentration-dependent effects of anticonvulsant enaminone methyl 4-(4′-bromophenyl)aminocyclohex-3-en-6-methyl-2-oxo-1-oate on neuronal excitability in vitro. **Neuroscience**, v. 141, n. 1, p. 345–356, 2006.

ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (FREDERICK NATIONAL LABORATORY FOR CANCER RESEARCH). Postoperative Analgesic and Care Recommendations for Mice. p. 2–3, 2011.

APERIA, A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 1, p. 44–52, 2007.

BAECHER, S. et al. No endogenous ouabain is detectable in human plasma by ultra-sensitive UPLC-MS/MS. **Clinica Chimica Acta**, v. 431, p. 87–92, 2014.

BARREIRA, A. A.; LISON, M. P.; SPECIALI, J. G. Tonic epileptic crisis and complex and mixed atypical absences in Lennox-Gastaut syndrome in patients over 6 years of age. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 40, n. 4, p. 327–38, dez. 1982.

BAULAC, M.; PITKÄNEN, A. Research priorities in epilepsy for the next decade-A representative view of the European scientific community: Summary of the ILAE Epilepsy Research Workshop, Brussels, 17-18 January 2008. **Epilepsia**, v. 50, n. 3, p. 571–578, mar. 2009.

BEHR, C. Epidemiology of epilepsy. **Revue Neurologique**, v. 172, n. 6, p. 27–36, 2016.

BENARROCH, E. E. Na+, K+-ATPase: Functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. **Neurology**, v. 76, n. 3, p. 287–293, 2011.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676–685, 2010.

BERG, A. T.; TESTA, F. M.; LEVY, S. R. Complete remission in nonsyndromic childhood-onset epilepsy. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 4, p. 566–573, out. 2011.

BIRKENAES, A. B. et al. The Level of Cardiovascular Risk Factors in Bipolar Disorder Equals That of Schizophrenia: A Comparative Study. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 68, n. 6, p. 917–923, 2007.

BLAUSTEIN, M. et al. How Does the Brain Talk to the Arteries and Heart? **FASEB J**, v. 29, n. 1_Supplement, p. 984.3-, 1 abr. 2015.

BLAUSTEIN, M. P. Why isn't endogenous ouabain more widely accepted? **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 307, n. 5, p. H635–H639, 2014.

BLAUSTEIN, M. P. et al. Pivotal role of α2 Na^+ pumps and their high affinity ouabain binding site in cardiovascular health and disease. **The Journal of Physiology**, jun. 2016.

BLUME, W. T. et al. Glossary of Descriptive Terminology for Ictal Semiology : Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 9, p. 1212–1218,

2001.

BRANDT, C. et al. Effective termination of status epilepticus by rational polypharmacy in the lithium-pilocarpine model in rats: Window of opportunity to prevent epilepsy and prediction of epilepsy by biomarkers. **Neurobiology of Disease**, v. 75, p. 78–90, 2015.

BRÜNING, C. A. et al. Diphenyl diselenide ameliorates behavioral and oxidative parameters in an animal model of mania induced by ouabain. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 38, n. 2, p. 168–174, 2012.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M. et al. Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. **BioMed research international**, v. 2014, p. 794930, 2014.

CAPUANI, C. et al. Defective glutamate and K + clearance by cortical astrocytes in familial hemiplegic migraine type 2. v. 1, p. 1–20, 2016.

CARBALLOSA-GONZALEZ, M. M. et al. EEG characterization of audiogenic seizures in the hamster strain GASH:Sal. **Epilepsy Research**, v. 106, p. 318–325, 2013.

CHI, Z. H. et al. Zinc transporter 3 immunohistochemical tracing of sprouting mossy fibres. **Neurochemistry International**, v. 52, n. 7, p. 1305–1309, 2008.

COBB, C. A.; COLE, M. P. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 84, p. 4–21, 2015.

COURTNEY, J. W. On the clinical differentiation of the various forms of ambulatory automatism. **The Journal of Abnormal Psychology**, v. 1, n. 3, p. 123–134, 1906.

COVANIS, A. et al. From global campaign to global commitment : The World Health Assembly ' s Resolution on epilepsy. p. 1–7, 2015.

CUNLIFFE, V. T. et al. Epilepsy research methods update: Understanding the causes of epileptic seizures and identifying new treatments using non-mammalian model organisms. **Seizure**, v. 24, n. C, p. 44–51, 2015.

CZUCZWAR, M. et al. Influence of orphenadrine upon the protective activity of various antiepileptic s in the maximal electroshock-induced convulsions in mice. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 4, p. 732–736, 2009.

DAI, H. et al. Ammonia-induced Na,K-ATPase/ouabain-mediated EGF receptor transactivation, MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling and ROS formation cause astrocyte swelling. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 6, p. 610–625, 2013.

DAVIDSON, D. L. W. et al. Ouabain Induced Seizures: Site of Production and Response to Anticonvulsants. **Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques**, v. 5, n. 4, p. 405–411, 18 nov. 1978.

DE FREITAS, R. M. et al. Neurochemical changes on oxidative stress in rat hippocampus during acute phase of pilocarpine-induced seizures. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 3, p. 341–345, 2010.

DE JUAN-SANZ, J. et al. Na+/K+-ATPase is a new interacting partner for the neuronal glycine transporter GlyT2 that downregulates its expression in vitro and in vivo. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 35, p. 14269–81, 2013.

DELLA-PACE, I. D. et al. Triterpene 3β, 6β, 16β trihidroxilup-20(29)-ene protects against

excitability and oxidative damage induced by pentylenetetrazol: The role of Na+,K+-ATPase activity. **Neuropharmacology**, v. 67, p. 455–464, 2013.

DONALDSON, J. et al. Regional sodium-pump activity and epilepsy. **LANCET**, p. 1129–1130, 1972.

DONG, Y. et al. Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway. **Apoptosis**, v. 16, n. 4, p. 394–403, 2011.

DORANDEU, F. et al. Ketamine combinations for the field treatment of soman-induced self-sustaining status epilepticus. Review of current data and perspectives. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, n. 1, p. 154–159, 2013.

DORETTO, M. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Differential audiogenic seizure sensitization by selective unilateral substantia nigra lesions in resistant Wistar rats. **Physiology & Behavior**, v. 58, n. 2, p. 273–282, ago. 1995.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421–431, 1990.

DUNNETT, S. B.; MELDRUM, A.; MUIR, J. L. **Frontal-striatal disconnection disrupts cognitive performance of the frontal-type in the ratNeuroscience**, 2005.

DUTRA MORAES, M. F.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; GARCIA-CAIRASCO, N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Research**, v. 39, n. 3, p. 251–259, maio 2000.

EL-MALLAKH, R. S. et al. Aberrant regulation of endogenous ouabain-like factor in bipolar subjects. **Psychiatry research**, v. 178, n. 1, p. 116–20, 2010.

ELZA MÁRCIA TARGAS YACUBIAN. GUILCA CONTRERAS-CAICEDO. LORETO RÍOS-POHL. **Tratamento Medicamentoso das Epilepsias.** 1. ed. São Paulo: Leitura Médica Ltda., 2014.

ENGEL, J. A Proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 6, p. 796–803, 20 dez. 2001.

ENGEL, J. Report of the ILAE classification core group. **Epilepsia**, v. 47, n. 9, p. 1558–1568, 2006a.

ENGEL, J. ILAE classification of epilepsy syndromes. **Epilepsy Research**, v. 47, n. SUPPL.1, p. 1558–1568, 2006b.

ENGEL JR, J.; SCHWARTZKROIN, P. A. What Should Be Modeled? n. November, p. 1–16, 2006.

EPPS, S. A. et al. Antidepressant and anticonvulsant effects of exercise in a rat model of epilepsy and depression comorbidity. **Epilepsy and Behavior**, v. 29, n. 1, p. 47–52, 2013.

FAINGOLD, C. L. Inferior Colliculus as Audiogenic Seizure Initiation Site- GABA Mechanisms Superior Colliculus in Audiogenic Seizure Network Periaqueductal Gray in Audiogenic Seizure Network Substantia Nigra in Audiogenic Seizure Network Brainstem Reticular Formation in. In: NOEBELS, J. L. et al. (Eds.). . **Jasper's Basic mechanisms of the Epilepsies**. 4. ed. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2012. p. 1–

10.

FANG, Y.; WANG, X. Ketamine for the treatment of refractory status epilepticus. **Seizure**, v. 30, p. 14–20, ago. 2015.

FEDERAL, C.; VETERIN, D. E. M.; VETERIN, M. Resolução Nº 1000 , De 11 De Maio De 2012. p. 1–9, 2012.

FEDOROVA, O. V. et al. A novel pathway of biosynthesis of mammalian endogenous steroids: adrenocortical bufadienolide marinobufagenin starts from bile acids. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 9, n. 4, p. e11, 2015.

FERRY, B.; GERVASONI, D.; VOGT, C. **Stereotaxic Neurosurgery in Laboratory Rodent - Handbook on best practices**. 1ª ed. Paris: Springer, 2014.

FILHO, C. B. et al. Chronic unpredictable mild stress decreases BDNF and NGF levels and Na+,K+-ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: Antidepressant effect of chrysin. **Neuroscience**, v. 289, p. 367–380, 2015.

FISHER, R. S. et al. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy(ILAE) and the International Bureau for Epilepsy(IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470–472, 2005.

FISHER, R. S. et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014.

FISHER, R. S. Final Comments on the Process: ILAE Definition of Epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 492–493, 2014.

FISHER, R. S.; LEPPIK, I. Debate: When does a seizure imply epilepsy? **Epilepsia**, v. 49, n. SUPPL. 9, p. 7–12, 2008.

FLEISCHHACKER, W. W. et al. Comorbid somatic illnesses in patients with severe mental disorders: clinical, policy, and research challenges. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 69, n. 4, p. 514–9, abr. 2008.

FOO, K.; BLUMENTHAL, L.; MAN, H. Y. Regulation of neuronal bioenergy homeostasis by glutamate. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 3, p. 389–396, 2012.

FORNACIARI, G. et al. A medieval case of digitalis poisoning: the sudden death of Cangrande della Scala, lord of verona (1291–1329). **Journal of Archaeological Science**, v. 54, p. 162–167, 2015.

FREITAS, T. P. et al. Mitochondrial respiratory chain activity in an animal model of mania induced by ouabain. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 23, n. 3, p. 106–111, 2011.

FREMONT, R.; TEWARI, A.; KHODAKHAH, K. Aberrant Purkinje cell activity is the cause of dystonia in a shRNA-based mouse model of Rapid Onset Dystonia-Parkinsonism. **Neurobiology of Disease**, v. 82, p. 200–212, 2015.

FROM THE COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY, *. Proposal for Revised Clinical and Electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures. **Epilepsia**, v. 22, p. 489–501, 1981.

FUNCK, V. R. et al. Long-term decrease in Na+,K+-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. **Epilepsy Research**,

v. 108, n. 10, p. 1705–1710, 2014.

FUNCK, V. R. et al. Contrasting effects of Na(+), K(+)-ATPase activation on seizure activity in acute versus chronic models. **Neuroscience**, v. 298, p. 171–9, 2015.

GARCIA GARCIA, M. E.; GARCIA MORALES, I.; MATÍAS GUIU, J. Experimental models in epilepsy. **Neurología (English Edition)**, v. 25, n. 3, p. 181–188, abr. 2010.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Elucidating the neurotoxicity of the star fruit. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 49, p. 13067–13070, 2013.

GASTAUT, H. Clinical and Electroencephalographical Classification of Epileptic Seizures. **Epilepsia**, v. 11, n. 1, p. 102–112, 1970.

GOELLNER, E. et al. Timing of early and late seizure recurrence after temporal lobe epilepsy surgery. **Epilepsia**, v. 54, n. 11, p. 1933–1941, nov. 2013.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GULLEDGE, A. T. et al. A sodium-pump-mediated afterhyperpolarization in pyramidal neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 32, p. 13025–41, 7 ago. 2013.

HAMELIN, S.; DEPAULIS, A. Revisiting hippocampal sclerosis in mesial temporal lobe epilepsy according to the “two-hit” hypothesis. **Revue Neurologique**, v. 171, n. 3, p. 227–235, 2015.

HAMLYN, J. M.; MANUNTA, P. Endogenous cardiotonic steroids in kidney failure: A review and an hypothesis. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 22, n. 3, p. 232–244, 2015.

HART, Y. M. Epidemiology, natural history and classification of epilepsy. **Medicine (United Kingdom)**, v. 40, n. 9, p. 471–476, 2012.

HAUSER, A. Commentary: ILAE Definition of Epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 488–490, 2014.

HU, K. et al. Improved antitumor efficacy and reduced toxicity of liposomes containing bufadienolides. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 9, p. 1487–1494, 2011.

HUFF, M. O. et al. Effect of ethacrynic acid on the sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase activity and expression in Old Order Amish bipolar individuals. **Journal of affective disorders**, v. 123, n. 1–3, p. 303–7, 2010.

IZUMI, K. et al. Ouabain-induced seizures in rats: suppressive effects of taurine and gamma-aminobutyric acid. **Can.J.Physiol.Pharmacol.**, v. 51, n. 12, p. 885–889, 1973a.

IZUMI, K. et al. Ouabain-induced seizures in rats: modification by melatonin and melanocyte-stimulating hormone. **Can.J.Physiol Pharmacol.**, v. 51, n. 8, p. 572–578, 1973b.

IZUMI, K. et al. Ouabain-Induced Seizures in Rats : Relationship to Brain Monoamines. **Cnadian Journal of Biochemistry**, v. 51, p. 198–203, 1973c.

JACOBS, W. A.; BIGELOW, N. M. Ouabain or G-Strophanthin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 96, p. 647–658, 1932.

JIN, L.; INOUE, Y. Spontaneous periictal leaving behavior: A potential lateralizing sign in mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 50, n. 6, p. 1560–1565, 2009.

JOBE, P. C.; CHIN, A.; LINCOLN, P. Role of brain norepinephrine in audiogenic seizure in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 184, n. 1, p. 1–10, 1973.

JORNADA, L. K. et al. DNA damage after intracerebroventricular injection of ouabain in rats. **Neuroscience letters**, v. 471, n. 1, p. 6–9, 26 fev. 2010.

JORNADA, L. K. et al. Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. **Journal of psychiatric research**, v. 45, n. 2, p. 162–8, fev. 2011.

JUHASZOVA, M.; BLAUSTEIN, M. P. Distinct Distribution of Different Na+ Pump? Subunit Isoforms in Plasmalemma. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 834, n. 1 Na/K-ATPase, p. 524–536, nov. 1997.

KIM, R.-S.; LABELLA, F. Endogenous ligands and modulators of the digitalis receptor: some candidates. **Pharmacol Ther.**, v. 14, p. 391–409, 1981.

KIM, S. H. et al. Dose-dependent effect of intracerebroventricular injection of ouabain on the phosphorylation of the MEK1/2-ERK1/2-p90RSK pathway in the rat brain related to locomotor activity. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 7, p. 1637–1642, 2008.

KIM, S. H. et al. Intracerebroventricular administration of ouabain, a Na/K-ATPase inhibitor, activates mTOR signal pathways and protein translation in the rat frontal cortex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 73–82, 2013.

KIRSHENBAUM, G. S. et al. Decreased neuronal na +,K +-ATPase activity in atp1a3 heterozygous mice increases susceptibility to depression-like endophenotypes by chronic variable stress. **Genes, Brain and Behavior**, v. 10, n. 5, p. 542–550, 2011.

KLEE, R. et al. Network pharmacology for antiepileptogenesis: Tolerability of multitargeted drug combinations in nonepileptic vs. post-status epilepticus mice. **Epilepsy Research**, v. 118, p. 34–48, 2015.

KLEIN, S. et al. Sucrose consumption test reveals pharmacoresistant depression-associated behavior in two mouse models of temporal lobe epilepsy. **Experimental Neurology**, v. 263, p. 263–271, 2015.

KLIMANOVA, E. A. et al. Binding of ouabain and marinobufagenin leads to different structural changes in Na,K-ATPase and depends on the enzyme conformation. **FEBS Letters**, v. 589, n. 19, p. 2668–2674, 2015.

KOKARE, D. M. et al. A simple and inexpensive method to fabricate a cannula system for intracranial injections in rats and mice. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 64, n. 3, p. 246–250, 2011.

KRISHNA, A. B. et al. International Journal of Indigenous Medicinal Plants. **International Journal of Indigenous Medicinal Plants**, v. 48, n. 2, p. 1871–1895, 2015.

KUO, A.; SMITH, M. T. Theoretical and practical applications of the intracerebroventricular route for CSF sampling and drug administration in CNS drug discovery research: A mini review. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 233, p. 166–171, 2014.

LARSEN, B. R. et al. Glutamate transporter activity promotes enhanced Na^+/K^+-ATPase-mediated extracellular K^+ management during neuronal activity. **The Journal of Physiology**, v. 0, p. 1–15, 2016.

LARSEN, B. R.; STOICA, A.; MACAULAY, N. Managing Brain Extracellular K + during Neuronal Activity : The Physiological Role of the Na + / K + -ATPase Subunit Isoforms. v. 7, n. April, p. 1–10, 2016.

LEE, G.; HENDRIKS, J. Digoxin - don't dismiss it just yet. **European Journal of Cardiovascular Nursing**, p. 1474515115612272, 13 out. 2015.

LEVINE, M. V. et al. Allosteric Mechanisms of Molecular Machines at the Membrane: Transport by Sodium-Coupled Symporters. **Chemical Reviews**, p. acs.chemrev.5b00627, 2016.

LEWIS, L. K. et al. Endogenous ouabain is not ouabain. **Hypertension**, v. 64, n. 4, p. 680–683, 2014.

LIMA, I. V. DE A. et al. PI3Kγ deficiency enhances seizures severity and associated outcomes in a mouse model of convulsions induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. **Experimental Neurology**, v. 267, p. 123–134, 2015.

LIU, J.; XIE, Z. J. The sodium pump and cardiotonic steroids-induced signal transduction protein kinases and calcium-signaling microdomain in regulation of transporter trafficking. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 12, p. 1237–1245, 2010.

LOPES, M. W. et al. Region-specific alterations of AMPA receptor phosphorylation and signaling pathways in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemistry International**, 2015.

LÖSCHER, W. Animal Models of Drug-Refractory Epilepsy. In: PITKÄNEN, A.; SCHWARTZKROIN, P. A.; MOSHÉ, S. L. (Eds.). . San Diego: Elsevier Inc, 2006. p. 551–567.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359–368, 2011.

LÖSCHER, W. Single versus combinatorial therapies in status epilepticus: Novel data from preclinical models. **Epilepsy & Behavior**, mar. 2015.

LÖSCHER, W.; HIRSCH, L. J.; SCHMIDT, D. The enigma of the latent period in the development of symptomatic acquired epilepsy - Traditional view versus new concepts. **Epilepsy and Behavior**, v. 52, p. 78–92, 2015.

LOWENSTEIN, D. H.; BLECK, T.; MACDONALD, R. L. It's time to revise the definition of status epilepticus. **Epilepsia**, v. 40, n. 1, p. 120–122, 1999.

MA, J. et al. Increasing evidence for and regulation of a human placental endogenous digitalis-like factor. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif**, v. 19, n. 4, p. 437–448, 2012.

MAGIORKINIS, E.; SIDIROPOULOU, K.; DIAMANTIS, A. Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity. **Epilepsy and Behavior**, v. 17, n. 1, p. 103–108, 2010.

MATHERN, G. W.; BENINSIG, L.; NEHLIG, A. From the editors: Epilepsia's 2014

operational definition of epilepsy survey. **Epilepsia**, v. 55, n. 11, p. 1683–1687, 2014.

MISHRA, M. et al. Dehydroepiandrosterone's antiepileptic action in FeCl3-induced epileptogenesis involves upregulation of glutamate transporters. **Epilepsy research**, v. 106, n. 1–2, p. 83–91, set. 2013.

MOREIRA, J. D. et al. Short-term alterations in hippocampal glutamate transport system caused by one-single neonatal seizure episode: Implications on behavioral performance in adulthood. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 2, p. 217–223, 2011.

MOSHÉ, S. L. et al. Epilepsy: New advances. **The Lancet**, v. 385, n. 9971, p. 884–898, 2015.

MULA, M.; SANDER, J. W. Psychosocial aspects of epilepsy: a wider approach. **British Journal of Psychiatry Open**, v. 2, n. 4, p. 270–274, 17 ago. 2016.

MUÑOZ, L. J. et al. The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH: Sal. **Epilepsy and Behavior**, v. xxx, n. x, p. xxx–xxx, 2016.

MURPHY, N. P.; MAIDMENT, N. T. Orphanin FQ/Nociceptin Modulation of Mesolimbic Dopamine Transmission Determined by Microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, n. 1, p. 179–186, 18 jan. 2002.

OGAWA, H. et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na+,K+-ATPase) with bound potassium and ouabain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 33, p. 13742–7, 18 ago. 2009.

OGAWA, H. et al. Sequential substitution of K+ bound to Na+,K+-ATPase visualized by X-ray crystallography. **Nature Communications**, v. 6, p. 8004, 10 ago. 2015.

ORELLANA, A. M. et al. Cardiotonic Steroids as Modulators of Neuroinflammation. **Frontiers in endocrinology**, v. 7, n. February, p. 10, 2016.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, 2007.

PARK, H. Y. et al. Calotropin: A Cardenolide from *Calotropis gigantea* that Inhibits Wnt Signaling by Increasing Casein Kinase 1α in Colon Cancer Cells. **ChemBioChem**, v. 15, n. 6, p. 872–878, 14 abr. 2014.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 4ª ed. San Diego: Academic Press, 1998.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

PERERA CÓRDOVA, W. H. et al. Bufadienolides from parotoid gland secretions of Cuban toad Peltophryne fustiger (Bufonidae): Inhibition of human kidney Na+/K+-ATPase activity. **Toxicon**, v. 110, p. 27–34, 2016.

PERUCCA, E. Introduction to the Clinical Definition of Epilepsy by the ILAE President. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 473–474, 2014.

POLETAEVA, I. I. et al. The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65years. **Epilepsy & behavior : E&B**, 2015.

PRIETO-MARTÍN, A. I. et al. Opposite caudal versus ros

tral brain nitric oxide synthase response to generalized seizures in a novel rodent model of reflex epilepsy. **Life Sciences**, v. 90, n. 13, p. 531–537, 2012.

PRIETO-MARTÍN, A. I. et al. Molecular and neurochemical substrates of the audiogenic seizure strains: The GASH:Sal model. **Epilepsy & Behavior**, 2015.

PUSCHETT, J. B.; AGUNANNE, E.; UDDIN, M. N. Emerging role of the bufadienolides in cardiovascular and kidney diseases. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 56, n. 2, p. 359–370, 2010.

RAMAKRISHNAN, L. et al. Riluzole attenuates the effects of chemoconvulsants acting on glutamatergic and GABAergic neurotransmission in the planarian Dugesia tigrina. **European journal of pharmacology**, v. 718, n. 1–3, p. 493–501, 15 out. 2013.

RAVNA, A. W. et al. Membrane Transporters: Structure, Function and Targets for Drug Design. In: [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 15–51.

REJDAK, K. et al. Orphenadrine induces secondarily generalized convulsive status epilepticus in rats. **Brain research bulletin**, v. 84, n. 6, p. 389–93, 2011.

REJDAK, K. et al. Orphenadrine-induced convulsive status epilepticus in rats responds to the NMDA antagonist dizocilpine. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 3, p. 399–403, 2014.

RIEGEL, R. E. et al. Animal model of mania induced by ouabain: Evidence of oxidative stress in submitochondrial particles of the rat brain. **Neurochemistry International**, v. 55, n. 7, p. 491–495, 2009.

RIEGEL, R. E. et al. Intracerebroventricular ouabain administration induces oxidative stress in the rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 3, p. 233–237, 2010.

ROSE, E. M. et al. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 25, p. 8143–55, 2009.

SCHWARTZKROIN, P. A.; ENGEL, J. What Good Are Animal Models? In: PITKÄNEN, A.; SCHWARTZKROIN, P. A.; MOSHÉ, S. L. (Eds.). . **Models of Seizures and Epilepsy**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 659–668.

SCORZA, F. A. et al. Sudden cardiac death in epilepsy disappoints, but epileptologists keep faith. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 7, p. 570–573, jul. 2016.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 24 out. 1968.

SHEEAN, R. K. et al. Links between l-glutamate transporters, Na+/K+-ATPase and cytoskeleton in astrocytes: Evidence following inhibition with rottlerin. **Neuroscience**, v. 254, p. 335–346, 2013.

SHINODA, T. et al. Crystal structure of the sodium–potassium pump at 2.4 Å resolution. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 446–450, 21 maio 2009.

SHORVON, S.; TRINKA, E. Status epilepticus-making progress. **Epilepsia**, v. 52, n. SUPPL. 8, p. 1–2, 2011.

SIMONINI, M. et al. Endogenous Ouabain: An Old Cardiotonic Steroid as a New Biomarker

of Heart Failure and a Predictor of Mortality after Cardiac Surgery. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

SKOU, J. C. The identification of the sodium pump. **Bioscience Reports**, v. 24, n. 4–5, p. 437–451, 2005.

SONG, H. et al. Ouabain-digoxin antagonism in rat arteries and neurones. **The Journal of physiology**, v. 592, n. Pt 5, p. 941–69, 2014.

SOUZA, L. C. et al. The protective effect of melatonin against brain oxidative stress and hyperlocomotion in a rat model of mania induced by ouabain. **Behavioural Brain Research**, v. 271, p. 316–324, 2014.

STALEY, K. Molecular mechanisms of epilepsy. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 367–372, 24 fev. 2015.

STEVENSON, W. E. EPILEPSY AND GUNSHOT WOUNDS OF THE HEAD. **Brain**, v. 54, n. 2, p. 214–224, 1931.

STUCKY, M. A.; GOLDBERGER, Z. D. Digoxin: its role in contemporary medicine. **Postgraduate medical journal**, v. 91, n. 1079, p. 514–8, set. 2015.

SYNOWIEC, A. S. et al. Ketamine use in the treatment of refractory status epilepticus. **Epilepsy Research**, v. 105, n. 1–2, p. 183–188, 2013.

TONIN, P. T. et al. Effects of ouabain on cytokine/chemokine levels in an animal model of mania. **Journal of neuroimmunology**, v. 276, n. 1–2, p. 236–9, 15 nov. 2014.

TOYOSHIMA, C.; KANAI, R.; CORNELIUS, F. First crystal structures of Na +,K +-ATPase: New light on the oldest ion pump. **Structure**, v. 19, n. 12, p. 1732–1738, 2011.

TRACY GLAUSER, MD, 1 et al. Evidence-Based Guideline: Treatment of Convulsive Status Epilepticus in Children and Adults: Report of the Guideline Committee of the American Epilepsy Society. **Epilepsy Currents**, v. 16, n. 1, p. 48–61, 2016.

TRINKA, E. et al. A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**, v. 56, n. 10, p. 1515–1523, 2015.

TRINKA, E.; HÖFLER, J.; ZERBS, A. Causes of status epilepticus. **Epilepsia**, v. 53, n. SUPPL. 4, p. 127–138, 2012.

VAILLEND, C. Mechanisms of Neuronal Hyperexcitability Caused by Partial Inhibition of Na+-K+-ATPases in the Rat CA1 Hippocampal Region. **Journal of Neurophysiology**, v. 88, n. 6, p. 2963–2978, 2002.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, jan. 2007.

VALVASSORI, S. S. et al. Effects of mood stabilizers on oxidative stress-induced cell death signaling pathways in the brains of rats subjected to the ouabain-induced animal model of mania. **Journal of Psychiatric Research**, v. 65, p. 63–70, 2015.

VANCAMPFORT, D. et al. Metabolic Syndrome and Metabolic Abnormalities in Bipolar Disorder: A Meta-Analysis of Prevalence Rates and Moderators. **American Journal of Psychiatry**, v. 170, n. 3, p. 265–274, mar. 2013.

VELÍSEK, L. Models of Chemically-Induced Acute Seizures. **Models of Seizures and Epilepsy**, p. 127–152, 2006.

VELISKOVA, J. Behavioral Characterization of seizures in rats. In: PITKÄNEN, A.; SCHWARTZKROIN, P. A.; MOSHÉ, S. L. (Eds.). . **Models of Seizure and Epilepsy**. [s.l: s.n.]. p. 601–611.

VINOGRADOVA, L. V. Audiogenic kindling and secondary subcortico-cortical epileptogenesis : Behavioral correlates and electrographic features. **Epilepsy & Behavior**, 2015.

VINOGRADOVA, L. V; GRINENKO, O. A. Ictal electrographic pattern of focal subcortical seizures induced by sound in rats. **Brain Research**, v. 1635, p. 161–168, 2016.

WESTMAN, J. et al. Cardiovascular mortality in bipolar disorder: a population-based cohort study in Sweden. **BMJ open**, v. 3, n. 4, p. e002373, 2013.

WHITE, H. S. et al. Therapeutic Assays for the Identification and Characterization of Antiepileptic and Antiepileptogenic Drugs. In: **Models of Seizures and Epilepsy**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 539–549.

XIE, Z.; ASKARI, A. Na+/K+-ATPase as a signal transducer. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 10, p. 2434–2439, 2002.

YAMAGATA, Y. et al. Regulation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase by NMDA-receptor-induced seizure activity in cortical slices. **Brain research**, v. 1507, p. 1–10, 24 abr. 2013.

YU, H. S. et al. Activation of Akt signaling in rat brain by intracerebroventricular injection of ouabain: A rat model for mania. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 403–406, 2010.

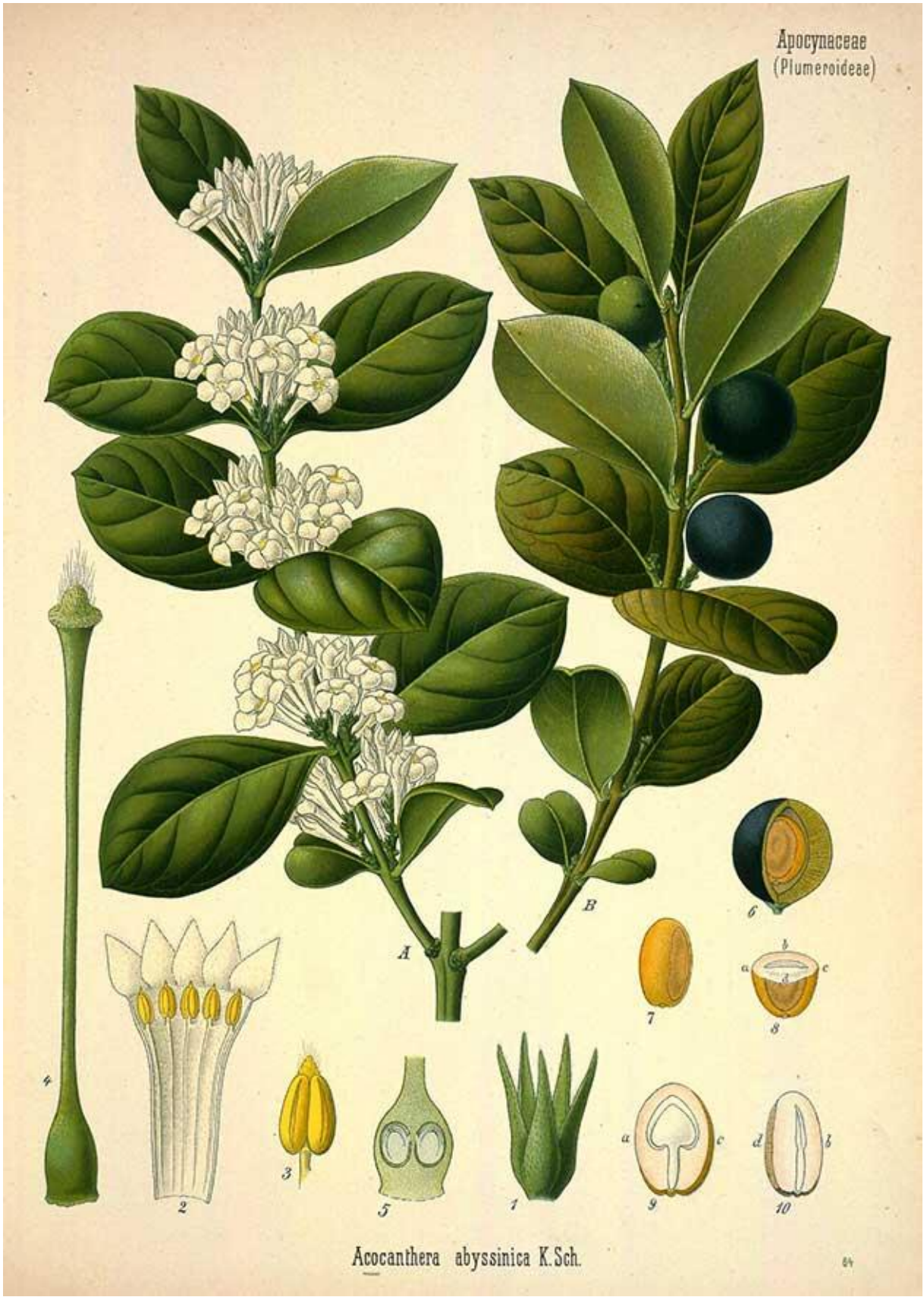
YU, H. S. et al. Intracerebroventricular administration of ouabain, a Na/K-ATPase inhibitor, activates tyrosine hydroxylase through extracellular signal-regulated kinase in rat striatum. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 6, p. 779–786, 2011.

ZALESKA, M. M.; FLOYD, R. A. Regional lipid peroxidation in rat brain in vitro: Possible role of endogenous iron. **Neurochemical Research**, v. 10, n. 3, p. 397–410, mar. 1985.

ZHOU, Y. et al. EAAT2 (GLT-1; slc1a2) glutamate transporters reconstituted in liposomes argues against heteroexchange being substantially faster than net uptake. **J Neurosci**, v. 34, n. 40, p. 13472–13485, 2014.

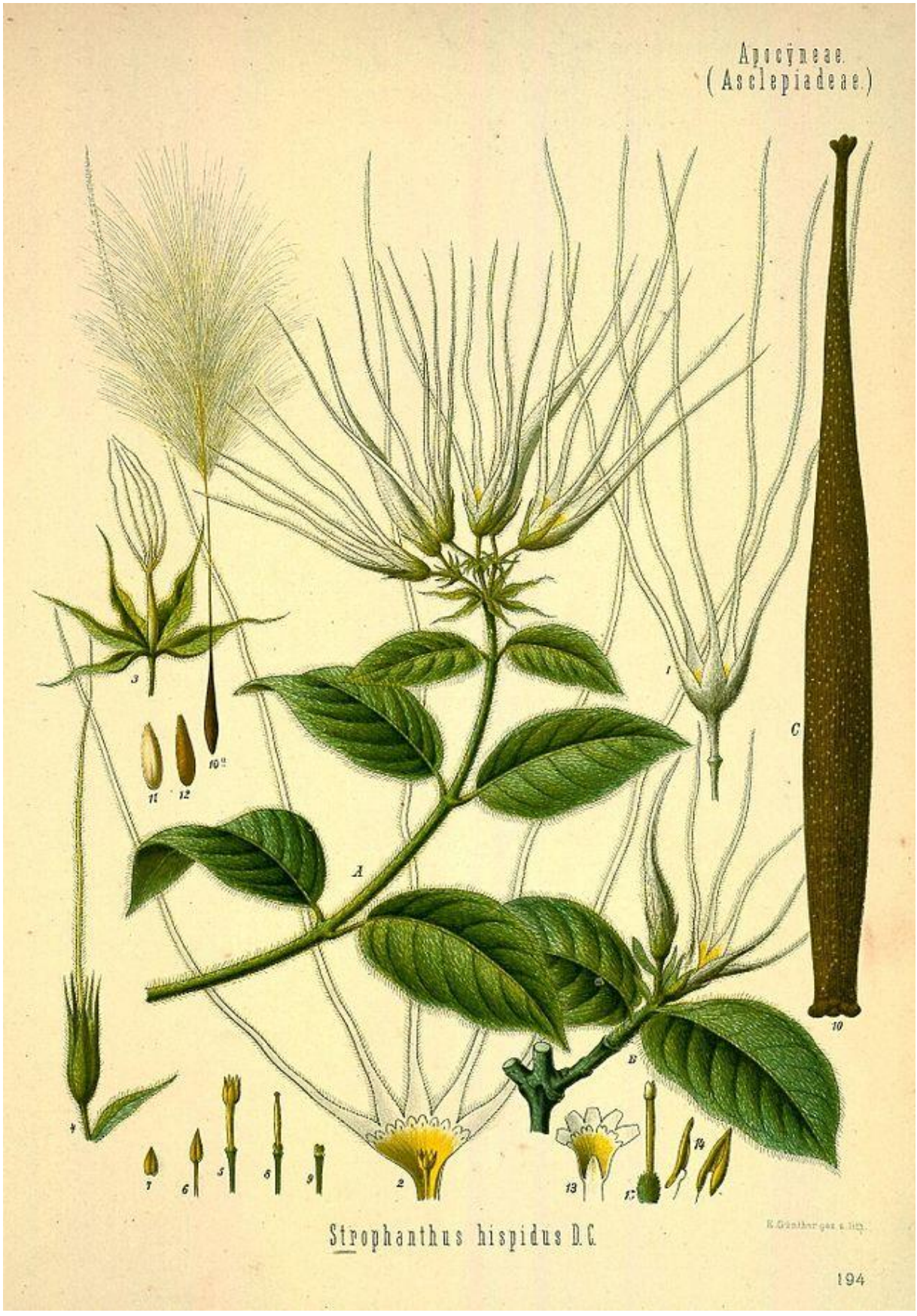
ZULFIKER, A. H. M. et al. Multi-constituent identification in Australian cane toad skin extracts using high-performance liquid chromatography high-resolution tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 129, p. 260–272, 2016.

ANEXO A - *Acokanthera sp.*



Fonte: http://plantcurator.com/free-vintage-medicinal-plant-illustrations/

ANEXO B - *Strophanthus sp.*



Fonte: http://plantcurator.com/free-vintage-medicinal-plant-illustrations/