

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

WANESSA DOS SANTOS PEREIRA

Efeito do ritmo circadiano alterado no processo epileptogênico.

Maceió
2020

WANEISSA DOS SANTOS PEREIRA

Efeito do ritmo circadiano alterado no processo epileptogênico.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador(a): Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí

Maceió
2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

P436c Pereira, Wanessa dos Santos.
Efeito do ritmo circadiano alterado no processo epileptogênico / Wanessa dos Santos Pereira. – 2020.
71 f. : il., figs. e tabs. color.

Orientador: Daniel Leite Góes Gitai.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 58-67.
Anexos: f. 69-71.

1. Epilepsia do lobo temporal. 2. Ritmos circadianos. 3. Status epilepticus. 4. Claro constante. I. Título.

CDU: 616.853: 612

Dedico este trabalho a minha filha Letícia pelo amor, pela compreensão e toda paciência que teve para entender minhas ausências.

RESUMO

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é uma condição neurológica caracterizada pela ocorrência de crises recorrentes e espontâneas (CREs). A literatura indica uma interação bidirecional entre a ELT e o sistema circadiano, considerando o padrão oscilatório das crises epiléticas, a influência do ritmo circadiano na susceptibilidade às crises e capacidade das CREs de interferir na oscilação de outros ritmos biológicos, incluindo sono-vigília, temperatura corporal e atividade locomotora. Para contribuir com um melhor entendimento da relação entre ritmo circadiano e a epilepsia, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito de um ritmo circadiano alterado no processo epileptogênico. Utilizamos um modelo de ELTM induzida por Li-PILO o status epilepticus (SE), para avaliar o efeito de diferentes exposições crônicas ao claro constante (CC) na (o): i. susceptibilidade ao SE induzido por PILO e na gravidade das crises durante o SE; ii. frequência e gravidade das CREs; iii. distribuição temporal das CREs ao longo de 24h; iv. ritmo de 24h da atividade locomotora (ALE). Os animais pré-tratados por duas semanas em CC (CC 2s) apresentaram alteração no ritmo da ALE, com aumento de período ($25.01 \pm 0,09h$) e menor amplitude relativa – rAMP ($0.59 \pm 0,028$) em relação ao grupo controle ($23.94 \pm 0,03h$; $0.87 \pm 0,0039$, $p < 0.0001$). Os animais pré-tratados por 7 (CC 7s) semanas apresentaram o ritmo de ALE abolido. Os animais em CC 2s apresentaram redução de 56% (41.64 ± 3.24) do total das crises durante o SE em relação aos animais controle (74.48 ± 8.7 , $p = 0.001$); enquanto os animais CC 7s apresentaram um aumento de 72% (128.25 ± 21.5 , $p = 0.019$) no total das crises. Entretanto, o tratamento com CC por duas ou 7 semanas realizado em animais epiléticos não alterou a gravidade das CREs nas comparações antes e depois do tratamento. Em relação a distribuição temporal das CREs, observamos que CC 2s ou CC 7s aboliu o padrão oscilatório de 24h. Por outro lado, em relação ao ritmo da ALE, os grupos de animais epiléticos em condições de CC apresentaram proporções variadas de animais rítmicos e arrítmicos, sendo maior proporção de animais arrítmicos nos ratos expostos ao CC por 7 semanas. Os animais epiléticos CC que mantiveram o ritmo da ALE apresentaram um período de ritmicidade maior ($25.65 \pm 0.3h$) que o grupo epilético CE (24.91 ± 0.43 , $p < 0.0001$). Observou-se diminuição na rAMP dos grupos CC, sendo menos estáveis e mais fragmentados que o grupo controle. Ocorreu redução significativa do rAMP no grupo epilético CC 2s (0.14 ± 0.031 , $p < 0.0001$) e LL7s (0.35 ± 0.06 , $p = 0.01$), em relação ao grupo epilético LD (0.63 ± 0.068). O claroconstante por um longo prazo provoca rupturas em diferentes ritmos biológicos podendo levar a interrupção do padrão oscilatório. Em nosso estudo, o ritmo de ALE assim como das CREs são alterados nos animais expostos ao CC. Os animais epiléticos CC que mantiveram o ritmo da ALE, apresentaram um ritmo bastante enfraquecido e instável. O conjunto dos dados sugere que mecanismos de controle do ritmo estão associados à ritmicidade das CRES límbicas e a susceptibilidade das crises durante o SE. A caracterização da oscilação temporal de moléculas envolvidas em vias pro-convulsivantes ou anti-convulsivantes associadas a indução do SE poderá contribuir para o entendimento do efeito da luz constante na fase aguda do processo epileptogênico. Além do mais, o estudo indica que as crises epiléticas espontâneas, *per se*, alteram o ritmo da ALE e que essa alteração é agravada em condição e luz constante, possivelmente devido a um efeito combinado da atividade epilética e da luz sobre o sistema de controle do ritmo.

Palavras-chave: Epilepsia do lobo temporal; Status Epilepticus (SE); Lítio-Pilocarpina; Ritmo circadiano; claro constante.

ABSTRACT

Temporal lobe epilepsy (TLE) is a neurological condition characterized by the occurrence of recurrent and spontaneous seizures (SRS). The literature indicates a bidirectional interaction between ELT and the circadian system, considering the oscillatory pattern of epileptic seizures, the influence of circadian rhythm on susceptibility to seizures and the ability of SRS to interfere in the oscillation of other biological rhythms, including sleep-wake, temperature and locomotor activity. In objective to contribute to a better understanding of the relationship between circadian rhythm and epilepsy, the present study investigated the effect of a change in circadian rhythm in the epileptogenic process. We used an ELTM-induced status epilepticus (SE) model to evaluate the effect of different chronic exposures to constant light (LL) on (o): i. susceptibility to SE induced by PILO and the severity of crises during SE; ii. frequency and severity of SRS; iii. temporal distribution of SRS over 24h; iv. 24h rhythm of locomotor activity (SLA). The animals pretreated for two weeks in LL (LL2w) showed an alteration in the SLA rhythm, with an increase in the period ($25.01 \pm 0.09\text{h}$) and less relative amplitude - rAMP (0.59 ± 0.028) than the control group ($23.94 \pm 0.03\text{h}$; 0.87 ± 0.0039 , $p < 0.0001$). The animals pretreated for 7 weeks (LL7w) had the SLA rhythm abolished. The LL2w animals showed a 56% reduction (41.64 ± 3.24) of the total seizures during the SE compared to the control animals (74.48 ± 8.7 , $p = 0.001$); while the LL7w animals showed an increase of 72% (128.25 ± 21.5 , $p = 0.019$) in the total of the crises. However, the treatment of LL for 2w or 7w performed on epileptic animals did not alter the severity of SRS in comparisons before and after treatment. In relation to the temporal distribution of SRS, we observed that LL2w for or LL7w abolished the 24-hour oscillatory pattern. On the other hand, the SLA rhythm, the groups of epileptic animals in conditions of LL presented varied proportions of rhythmic and arrhythmic animals, with a higher proportion of arrhythmic animals in rats exposed to LL7w. The LL epileptic animals that maintained the ALE rhythm has a longer rhythm period ($25.65 \pm 0.3\text{h}$) than the LD epileptic group (24.91 ± 0.43 , $p < 0.0001$). A decrease in the rAMP of the LL groups was observed, being less stable and more fragmented than the control group. There was a significant reduction in rAMP in the epileptic group LL2w (0.14 ± 0.031 , $p < 0.0001$) and LL7w (0.35 ± 0.06 , $p = 0.01$), in relation to the epileptic group LD (0.63 ± 0.068). Constant light for a long time causes disruptions at different biological rhythms and may lead to an interruption of the oscillatory pattern. In our study, the rhythm of SLA as well as SRS is altered in animals exposed to LL. The LL epileptic animals that maintained the SLA rhythm, showed a very weak and unstable rhythm. The data set suggests that rhythm control mechanisms are associated with the rhythmicity of limbic seizures and the susceptibility of crises during SE. The characterization of the temporal oscillation of molecules involved in pro-convulsive or anti-convulsive pathways associated with SE induction may contribute to the understanding of the effect of constant light in the acute phase of the epileptogenic process. Furthermore, the study indicates that SRS, *per se*, alter the rhythm of SLA and that this alteration is aggravated in constant light and condition, possibly due to a combined effect of epileptic activity and light on the control system of the rhythm.

Keywords: Temporal lobe epilepsy; Status Epilepticus (SE); Lithium-Pilocarpine; Circadian rhythm; Exposure to constant light.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

t: Período

A: amplitude do ritmo

ϕ : fase de um ritmo

NSQ: Núcleos supraquiasmáticos

ipRGC: Células ganglionares da retina fotossensíveis

TRH: Trato retino-hipotalâmico

Bmal: Brain and muscle Arnt-like protein-1

Cry1: Cryptochrome Circadian Regulator 1

Cry2: Cryptochrome Circadian Regulator 2

Clock: Circadian locomotor output cycle kaput

CCGs: Clock-controlled genes

CREs: Crises recorrentes e espontâneas

CRF: Curva de resposta de fase

Per1: Period Circadian Regulator 1

Per2: Period Circadian Regulator 2

EH: Esclerose hipocampal

ELT: Epilepsia do lobo temporal

ELTM: Epilepsia do lobo temporal mesial

ELTM-EH: epilepsia do lobo temporal mesial associada a esclerose hipocampal

SE: *Status Epilepticus*

CE: Ciclo claro-escuro ou ciclo 12h/12h

CC: Claro constante ou luz constante

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Ritmo Circadiano	11
1.2 Relógio Molecular	14
1.3 Luz como modulador do ritmo circadiano	18
1.4 Luz e doenças neurológicas.....	23
1.5 Epilepsia e Ritmo Circadiano	26
1.6 Objetivos.....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1 Animais	31
2.1.1 Grupos experimentais	31
2.2 Indução do Status epilepticus (SE)	33
2.3 Avaliação das crises do <i>Status Epilepticus</i>	34
2.4 Avaliação das Crises Recorrentes e Espontâneas (CREs).....	35
2.5 Registro de Atividade Locomotora Espontânea (ALE)	35
2.6 Análise da ritmicidade circadiana das CREs e da ALE	35
2.7 Análises estatísticas	36
3. RESULTADOS	37
3.1 Efeito da luz constante sobre atividade locomotora e das crises agudas durante o SE	38
3.2 A evolução temporal das CREs e os efeitos da exposição ao claro constante nas CREs.....	41
3.3 Estudo da periodicidade das CREs	42
3.4 Estudo do ritmo circadiano da ALE	44
4. DISCUSSÃO	48
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6. REFERÊNCIAS	57
7. ANEXOS	68
7.1 Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (Nº 62/2014 e 17/2017	69
7.2 Artigo em colaboração	70

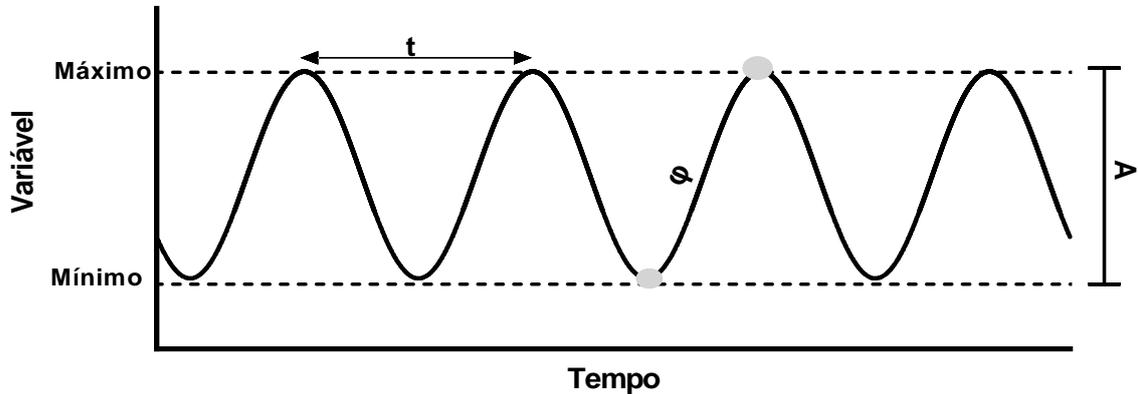
1 INTRODUÇÃO

1.1 Ritmos Circadiano

Os ritmos biológicos são eventos de carácter cíclico, recorrente e periódico. (ARAUJO; MARQUES, 2002). Alguns ritmos são respostas aos ciclos ambientais, enquanto outros são gerados endogenamente e podem responder adicionalmente aos ciclos ambientais. De maneira geral, os ritmos biológicos permitem aos seres vivos uma organização temporal para a manutenção da vida, pois envolvem processos essenciais que incluem aspectos comportamentais, fisiológicos e bioquímicos (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2005; REFINETTI, 2008). No entanto, para ser considerado um ritmo biológico é necessário apresentar os seguintes parâmetros: período (t), amplitude (A) e fase (ϕ). O período é o intervalo de tempo que um evento/variável se repete. A amplitude é a diferença entre a média dos valores da variável e seu valor máximo ou mínimo. A fase de um ritmo refere-se a um momento determinado no ciclo (Figura 1) (MINORS; WATERHOUSE, 1981). De acordo com Halberg e col. (1959), os ritmos biológicos podem ser classificados em: a. infradiano, que apresentam períodos maiores que 28h; b. ultradianos, que apresentam períodos com menos de 20h; e c. circadianos, que possuem períodos com aproximadamente 24h. Sendo o ritmo circadiano o mais bem estudado dentro da cronobiologia, esta ciência estuda os fenômenos biológicos recorrentes que ocorrem em uma periodicidade determinada, podendo ou não ter uma correspondência temporal com ciclos ambientais (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2005; REFINETTI, 2008).

Os ritmos diários, quando livres de referências ambientais temporais, possuem um período próprio, denominados ritmos circadianos (do Latim: *circa* = “cerca de”; *dien* = “dia”) (CHANDRASHEKARAN, 1998). Em geral, os ritmos circadianos são bem ajustados a uma curva sinusoidal com um período aproximado de 24h (JANSEN et al., 2007) (Figura 1). Entretanto, estes ritmos podem sofrer modulações diante de fatores ambientais, como o ciclo claro/escuro (LD). Alguns comportamentos como o ciclo sono-vigília são ritmados ao longo do dia (ciclo LD), em indivíduos diurnos as atividades acontecem preferencialmente nos horários do dia, na presença da luz, e ao escurecer tendem-se a dormir, fazendo parte da rotina do indivíduo. Este ritmo comportamental é acompanhado pelos níveis circulantes de hormônios, como de melatonina e cortisol, assim como pela temperatura corporal interna (LOGAN; MCCLUNG, 2019; MARQUES; MENNA-BARRETO, 2005; REFINETTI, 2008).

Figura 1 - Curva sinusoidal e seus parâmetros de um ritmo circadiano hipotético



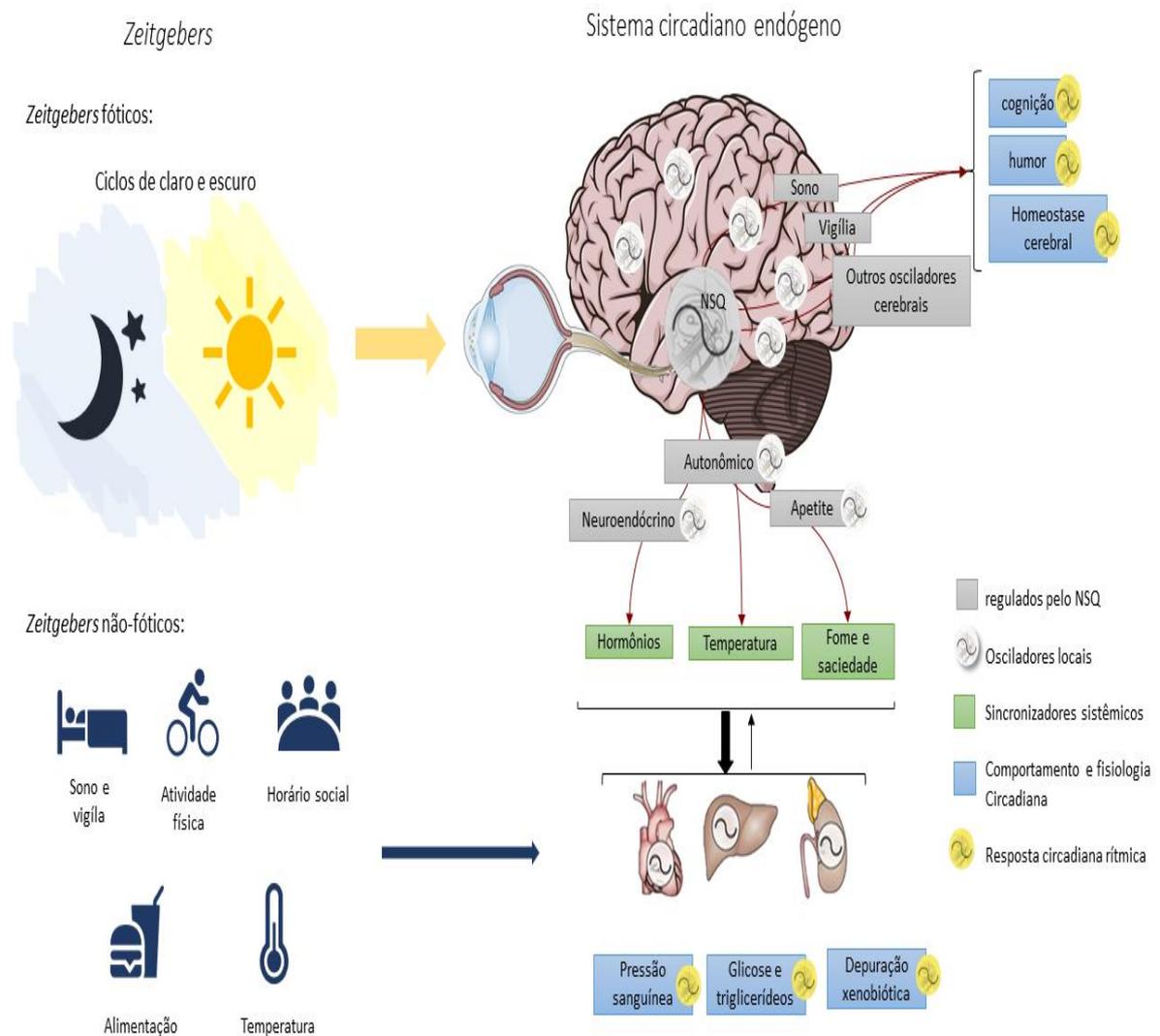
Esse tipo de curva é a ajusta-se a maioria dos ritmos circadianos. Estão representados os seguintes parâmetros: t : Período, é o intervalo de tempo que um evento/variável se repete; A : amplitude, é a diferença entre a média dos valores da variável e seu valor máximo ou mínimo; ϕ : fase de um ritmo refere-se a um momento determinado no ciclo. Fonte: AUTORA, 2020.

O ritmo circadiano nos mamíferos está presente em praticamente todas as células, e compreende um sistema oscilatório integrado, no qual a informação é recebida por um oscilador central e transmitida aos demais osciladores periféricos (COOMANS; RAMKISOENSING; MEIJER, 2015; LI; HU; ZHOU, 2012). Os Núcleos supraquiasmáticos (NSQs) localizados bilateralmente no hipotálamo anterior, acima do quiasma óptico, é considerado um oscilador central ou relógio central endógeno, capaz de controlar sistematicamente as atividades metabólicas, fisiológicas e comportamentais.

A localização anatômica dos NSQs permite-os que sejam os primeiros a receberem o *input* (entrada) de luz (sincronizador fótico). A luz é detectada pela retina, onde emerge a principal via aferente, as células ganglionares da retina fotossensíveis (ipRGC) que expressam melanopsinas, estas traduzem o sinal de luz para os NSQs via trato retino-hipotalâmico (TRH) (VIDENOVIC et al., 2014). A partir de então, a informação é passada para os sincronizadores periféricos nas células dos tecidos alvo, via sistema neuroendócrino e autônomo (Figura 2). Todavia, outros sincronizados não fóticos, como alimentação, atividade física, horário social,

temperatura e o ciclo sono-vigília, podem modular os ritmos endógenos por outras vias aferentes.

Figura 2 - Organização do sistema circadiano em mamíferos



O NSQ recebe a informação fótica diretamente da retina via trato retino-hipotalâmico (TRH), para garantir a sua sincronização aos ciclos de claro e escuro. O NSQ passa a informação circadiana para várias outras regiões cerebrais que contém osciladores circadianos e estão relacionados com funções autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais. Estes sincronizadores sistêmicos sincronizam os relógios moleculares de tecidos periféricos e esses, por sua vez, direcionam a expressão de genes circadianos que regulam os ritmos fisiológicos críticos para a saúde (por exemplo, ritmos relacionados a cognição, pressão arterial, metabolismo de triglicérides e função renal). Outros *Zeitgebers* ambientais importantes são ciclos de sono e vigília, horários de refeições e horários sociais, como trabalho e lazer. Fonte: MARQUES, 2018.

A rotação da terra em torno do seu próprio eixo resulta em duas condições diárias e opostas, o ciclo claro-escuro (LEGATES; FERNANDEZ; HATTAR, 2014). Sob estas condições normais, os organismos experimentam um padrão de 24 horas de claro e escuro, e o sistema circadiano da maioria dos animais usa as transições do dia para a noite para se alinhar ao tempo ambiental (HASTINGS; MAYWOOD; BRANCACCIO, 2018; LEGATES; FERNANDEZ; HATTAR, 2014). Esta informação é transmitida para os demais osciladores biológicos, localizados periféricamente (fígado, rim, coração, tecido adiposo). Apesar dos osciladores periféricos compartilharem a mesma maquinaria molecular do relógio central (NSQs), terem a capacidade gerar e manter o ritmo circadiano, esses sofrem influência de sincronizadores endógenos, como hormônios circulantes e temperatura corporal interna, por exemplo. Isto acontece diante da diferença no nível de acoplamento intracelular. Os neurônios dos NSQs formam uma rede resistente a modulações por sinais internos, enquanto que os osciladores periféricos são susceptíveis a mudanças endógenas (LIU et al., 2007; PARTCH; GREEN; TAKAHASHI, 2014). Esta rede garante que o oscilador central mantenha um tempo interno de aproximadamente 24 horas acoplado com o ciclo claro/escuro, enquanto os osciladores periféricos estão adaptados para refletir o *status* metabólico do tecido em que eles se localizam (DUFFIELD, 2003; STRATMANN; SCHIBLER, 2006).

1.2 Relógio molecular

Por muito tempo se desconheciam os verdadeiros componentes capazes de proporcionar a sincronização temporal interna. Inicialmente, acreditava-se que a atividade elétrica dos neurônios dos NSQs eram os responsáveis pelo ritmo endógeno, no entanto descobriu-se que os disparos elétricos eram mais um ritmo biológico gerado (SCHWARTZ; DAVIDSEN; SMITH, 1980; SCHWARTZ; GAINER, 1977). A partir das análises de base genética foi possível fornecer informações sobre os mecanismos responsáveis por conferir a ritmicidade endógena. Os primeiros estudos realizados em *Drosophila melanogaster* ajudou nos conhecimentos dos mecanismos de uma maquinaria molecular envolvida na organização temporal, possibilitando que os genes do relógio homólogos fossem clonados em camundongos

para avaliar características comportamentais, conforme tabela 1 (DUNLAP, 1990; REPPERT; WEAVER, 2002).

Tabela 1 - Componentes do mecanismo de relógio em camundongos

*Mutação	
Gene	Fenótipo comportamental
<i>Clock</i> [”]	Período longo, arrítmicos
<i>Bmal1 (Mop3)</i>	Arrítmicos
<i>Per1</i> ou <i>Per1 + Per3</i>	Período curto arrítmicos
<i>Per2</i> ou <i>Per2 + Per3</i>	Período curto, arrítmicos
<i>Per3</i>	Período curto
<i>Per1 + Per2</i>	Arrítmicos
<i>Cry1</i>	Período curto
<i>Cry2</i>	Período longo
<i>Cry1 + Cry2</i>	Arrítmicos
<i>CK1ϵkξ</i>	Período curto
<i>Rev-Erba</i>	Período curto

*Salvo indicação em contrário, as mutações listadas são mutações de deleção induzidas por mutagênese direcionada

”Mutação autossômica semidominante induzida por etilnitrosourea. A mutação é uma transversão de nucleotídeos em um sítio doador de *splice* causando salto de éxon e deleção de parte do domínio de transativação;

§Mutação autossômica semidominante espontânea descrita no hamster sírio. A enzima mutante é deficiente em sua capacidade de fosforilar o PER.

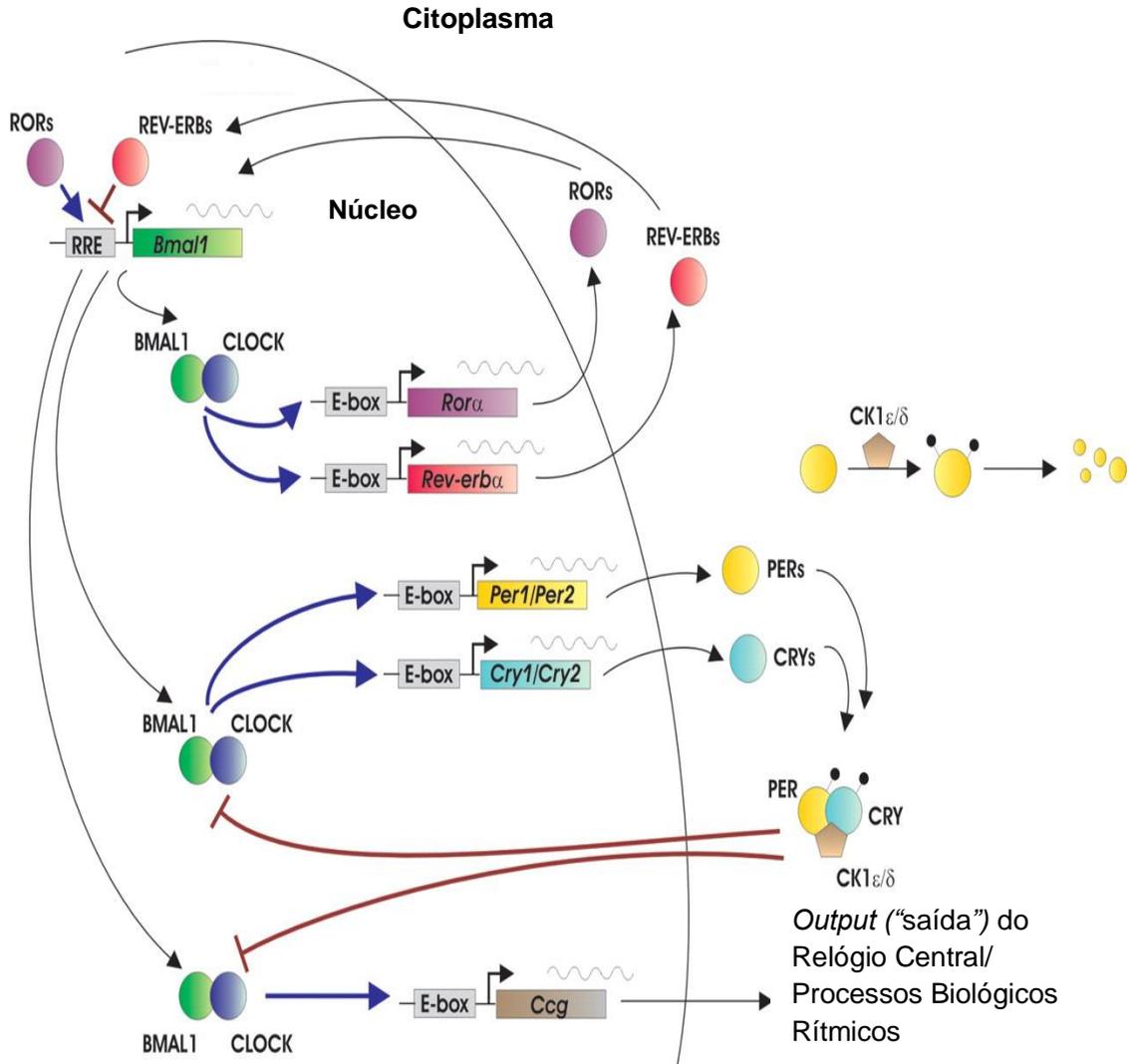
Fonte: Adaptado de REPPERT; WEAVER, 2002.

Além dos genes, denominados genes do relógio, observou-se um mecanismo de controle cíclico da expressão gênica. Os genes do relógio, presentes nos neurônios dos NSQs, tem a capacidade de autorregulação, os quais atuam como fatores de transcrição que regulam a expressão gênica uns aos outros (Figura 3) (DUNLAP, 1990; REPPERT; WEAVER, 2002). Este comportamento foi denominado como alças de retroalimentação de transcrição-tradução interligadas que oscilam com uma

periodicidade de 24 horas (LI; HU; ZHOU, 2012; MAZZOCCOLI; PAZIENZA; VINCIGUERRA, 2012; TAKAHASHI, 2017).

Sabe-se que existem duas alças principais de retroalimentação, uma ativadora (positiva) que é regulada pelas proteínas CLOCK e BMAL1, e a alça repressora (negativa) compostas pelas proteínas PER (*Period*) e CRY (*Cryptochrome*). As proteínas CLOCK e BMAL1, formam um heterodímero (CLOCK:BMAL1), que por sua vez podem se ligar a elementos reguladores contendo E-box, ativando a transcrição dos genes repressores *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* e *Cry2*, bem como outros genes alvos, denominados, em conjunto, de genes controlados pelo relógio biológico (*Clock-controlled genes* - CCGs), pois possuem o mesmo elemento E-box em sua região promotora, o que faz com que suas transcrições sejam dependentes dos componentes do relógio biológico (KO; TAKAHASHI, 2006). Interessantemente, os CCGs codificam as mais diversas substâncias, como neuropeptídeos, vasopressina, neurotransmissores, hormônios, fatores de transcrição, moléculas de sinalização intracelular, dentre outros. Estas moléculas representam um mecanismo molecular de eferência (*output*; saída) do relógio biológico central, fazendo com que a informação seja transmitida para os relógios periféricos, resultando na expressão de diversos ritmos endógenos circadianos (DUFFIELD, 2003).

Figura 3 - Alças de retroalimentação de transcrição-tradução que constituem o relógio circadiano dos mamíferos.



Fonte: KO; TAKAHASHI, 2006.

As proteínas repressoras PER e CRY interagem entre si, bem como com as caseína-quinase 1δ (CK1δ) e CK1ε, translocam-se para o núcleo da célula onde interagem com CLOCK:BMAL1 para reprimir sua própria transcrição. À medida que a repressão progride, a transcrição dos genes *Per* e *Cry* diminui e, conseqüentemente seus os níveis de proteína também. A transcrição de *Clock* e *Bmal1* pode recomeçar para iniciar um novo ciclo de transcrição-tradução, por um período de aproximadamente 24h (Figura 3) (TAKAHASHI, 2017).

O heterodímero CLOCK:BMAL1, também, aciona uma outra alça de retroalimentação, ativando a transcrição de *Rev-erb α* , cuja respectiva proteína compete com a proteína ROR (*Retinoid-related orphan receptors*) pela ligação ao elemento responsivo ao ROR (ROREs), presente na região promotora de *Bmal1*. Ao se ligar ao promotor, essas proteínas possuem ações antagônicas, onde ROR ativa a transcrição de *Bmal1* enquanto REV-ERB a inibe. O aumento da concentração de BMAL1, portanto, promove a inibição da transcrição do próprio gene por meio do aumento dos níveis de REV-ERB (Figura 3) (KO; TAKAHASHI, 2006; PARTCH; GREEN; TAKAHASHI, 2014).

Quando a expressão cíclica dos genes do relógio está sincronizada ao ciclo claro/escuro, diz-se que o oscilador central está acoplado às condições ambientais. Para isto, a maquinaria molecular (genes do relógio) sofre um *reset* diário sincronizado pela luz. Em mamíferos, acredita-se que as proteínas do oscilador central que exercem o papel de sincronizar as alças de autorregulação às informações ambientais sejam PER1 e PER2, isto porque os níveis de seus RNAm aumentam rapidamente (em alguns minutos) após um pulso de luz, enquanto os outros componentes não são imediatamente alterados (FIELD et al., 2000). Diante da função crucial da luz sob o ritmo circadiano, este fator representa um importante sincronizador ambiental na manutenção adequada de eventos biológicos, sendo capaz de modular a resposta do oscilador central e conseqüentemente alterar a resposta fisiológica e comportamental do indivíduo.

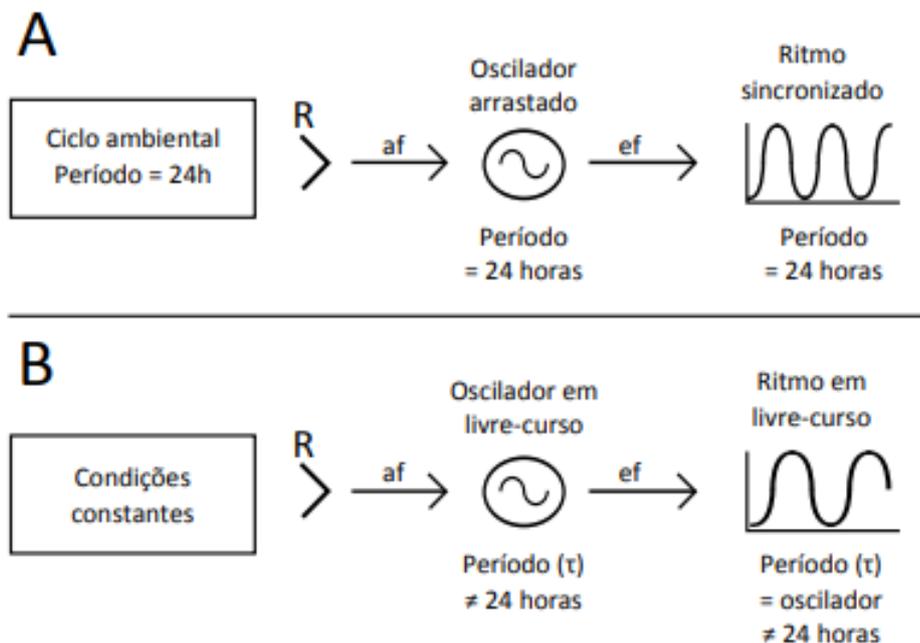
1.3 Luz como modulador do ritmo circadiano

Diante da funcionalidade da luz sobre os ritmos circadianos, protocolos usando a luz são frequentemente utilizados em experimentos como uma ferramenta para induzir respostas do relógio circadiano. Estas perturbações podem ser realizadas através de modelos de animais mantidos em livre-curso (Luz constante ou escuro constante) ou utilizando pulsos de luz ou escuridão em diferentes fase do dia, na perspectiva de estudar os efeitos de um sistema de controle circadiano em diferentes eventos biológicos, assim como em diversas doenças (REPPERT; WEAVER, 2002; CHIESA et al., 2010).

1.3.1 Livre-curso (free-running)

Sabe-se que uma das características do ritmo circadiano é a recorrência dos ciclos em determinado período, em condições isentas de pistas ambientais, o qual podemos definir como estado de “livre-curso” (do inglês, *free-running*). Durante este estado, o relógio biológico tende a manter-se sincronizado ou levemente arrastado em um período de aproximadamente 24h, permite que os organismos continuem, pelo menos por um tempo, antecipando mudanças cíclicas do ambiente, por exemplo (VIDENOVIC et al., 2014). Quando um evento biológico persiste em apresentar um ritmo circadiano mesmo em condições de escuro constante, sugere uma dependência do oscilador central, um ritmo endógeno.

Figura 4 - Funcionamento do sistema circadiano



A – O ciclo ambiental arrastador, com período de 24 horas, é percebido por um receptor (R), que envia o sinal para o oscilador circadiano por meio de vias aferentes (af). O oscilador é arrastado para o período do ciclo ambiental. Em consequência, o ritmo por ele gerado, e transmitido pelas eferências (ef), é observado em diversas variáveis biológicas, também com um período de 24 horas. B – O sistema continua funcionando mesmo na ausência de ciclos ambientais, porém o oscilador atua com um período próprio (τ), diferente de 24 horas, que se expressa também no ritmo final das variáveis reguladas. Fonte: FLÔRES, 2012.

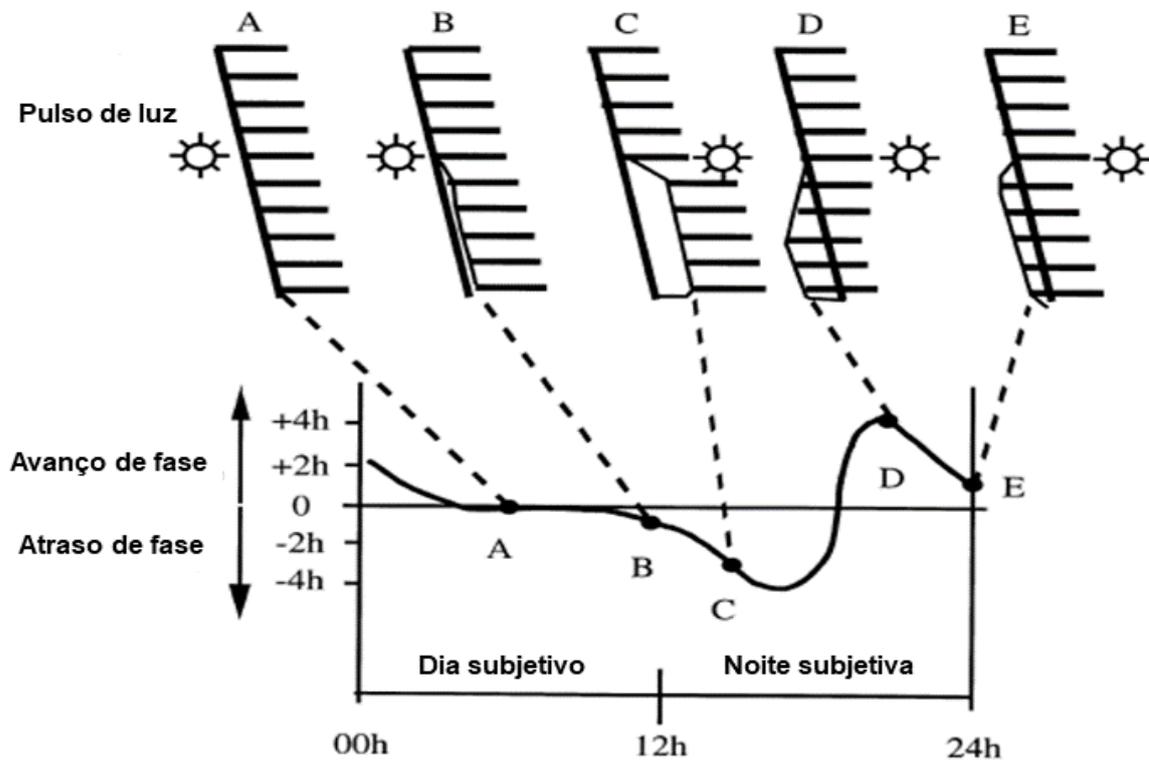
Em condições de luz constante este nível de acoplamento, entre o ambiente e os ritmos biológicos, podem sofrer uma disrupção, em que o relógio biológico passa a oscilar diferente ou mesmo ser interrompido em relação ao tempo externo (Figura 4B). Sendo possível observar uma dessincronização interna espontânea ou transitória ou a interrupção da oscilação circadiana. Este fenômeno equipara-se modelos genéticos para os relógio circadiano, como mutação nos genes *Bmal1* e *Cry1 + Cry2* (REPERT; WEAVER, 2002) ou a lesões no NSQs (FILIPSKI et al., 2003; CHIESA et al., 2010)

A dessincronização interna transitória, corresponde a uma dessincronização entre o tempo endógeno e o tempo externo (DEPRÈS-BRUMMER et al., 1995). Esse fenômeno parece ser comum em alguns atividade humanas, como em viagens transmeridianas (*Jet lag*) que produz incompatibilidade entre o tempo circadiano em relação ao local de destino, resultando em dessincronização transitório entre o tempo interno e externo, no qual o relógio circadiano é forçado gradualmente a resincronização em relação nova programação claro-escuro. Durante os dias imediatamente após a chegada, ocorre perturbação do sono, gerando diminuição no estado de alerta e aumento da fadiga durante o dia, e até mesmo sintomas gastrointestinais (BEDROSIAN; NELSON, 2017). Embora muitos trabalhadores de turno apresentam um comportamento adaptativo, para ficarem acordados à noite e dormindo durante o dia, eles manifestam redução do estado de alerta e um sono deficiente (BEDROSIAN; NELSON, 2017), os trabalhadores de turno também podem responder a uma dessincronização interna. Outra questão importante que a população humana tem enfrentado é a poluição luminosa durante a noite, este comportamento pode promover desalinhamento do sistema de controle circadiano. Este comportamento moderno, como uso excessivo de aparelhos eletrônicos na fase escura do dia, pode ativar processos de mudanças de fase de maneira inadequada, induzindo efeitos agudos, incluindo alterações no sono, estado de alerta, e níveis de melatonina. Muitos estudos indicam que mesmo baixos níveis de iluminação na noite pode reiniciar a fase circadiana e suprimir a liberação de melatonina, sugerindo que a exposição relativamente comum a luz artificial pode de fato afetar a função circadiana (GOOLEY et al. 2011; ZEITZER et al. 2000)

1.3.2 Curva de resposta de fase

Um estímulo de luz (pulso de luz brilhante) em um determinado momento do período pode perturbar o ritmo circadiano. Esta perturbação é denominada: deslocamento da fase (adiantamento ou atraso). Para este estudo utiliza-se uma curva de resposta de fase-CRF (figura 5), que consiste em uma representação gráfica do comportamento de um ritmo em livre curso submetido a estímulos em diferentes momentos do dia. Os termos “dia subjetivo” ou “noite subjetiva” são frequentemente usados para definir a fase de atividade ou de repouso de um organismo. Quando o pulso de luz é aplicado no dia subjetivo o comportamento do animal não é alterado (figura 5 A), no entanto se o pulso de luz acontece durante o fim do dia subjetivo (figura 5 B) ou durante o início da noite subjetiva (figura 5 C) é observado um atraso de fase. Entretanto, quando o pulso de luz é aplicado no fim da noite subjetiva (Figura 5 D-E) acontece um avanço de fase. Com estas informações podem ser descritas duas curvas de resposta de fase: 1) deslocamento de fase relativamente pequeno, sendo mais sensível ao início da escuridão, observado pelo atraso de fase quando o animal é exposto a pulso de luz durante o início da fase escura; e 2) em que ocorre maior sensibilidade ao pulso de luz, que resulta em um deslocamento de fase mais acentuado, caracterizado pelo avanço de fase, antecipando a atividade do animal.

Figura 5 - Curva de resposta de fase



No topo, são representados os actogramas de livre curso de um animal noturno, o tempo correspondente da estimulação de luz e o resultado subsequente da breve perturbação na atividade ritmo. De acordo com o tempo de estimulação da luz, é possível notar: em A (durante o dia) nenhum efeito sobre o Estágio; em B e C (respectivamente fim do dia e início do escuro) atraso de fase; em D e E (fim da noite), fase avançar. Na parte inferior, a curva de resposta de fase obtida informa sobre a direção e amplitude da mudança de fase (de acordo com Moore-Ede et al., 1982). Fonte: BENSTAALI et al., 2001.

Assim como é possível observar mudanças na atividade comportamental a partir do desacoplamento entre os sinais externos e os relógios internos, acredita-se que ocorram alterações nos genes do relógio que correlaciona-se com perturbações nos ritmos circadianos, podendo estar associados a muitos distúrbios metabólicos e neuropsiquiátricos (TAKAHASHI et al., 2008). Esta correlação é feita principalmente porque uma fração substancial dos genes expressos, cerca de 20 a 50% de todo genoma, sofrem oscilação circadiana a nível de transcrito (mRNA), sendo uma expressão rítmica relevante para cada tecido (KOJIMA; GREEN, 2015; TAKAHASHI,

2017; ZHANG et al., 2014). Estes genes, os CCGs, desempenham funções importantes na manutenção da homeostase do organismo.

1.4 Luz e doenças neurológicas

A cronoterapia é definida como um regime de tratamento desenvolvido com base nos ritmos circadianos do paciente. Pode estar relacionado à cronofarmacologia ou outras manipulações do relógio biológicos ou pisa externas (zeitgebers) (KALADCHIBACHI; FERNANDEZ, 2018; GITAÍ et al., 2019). A luz como potencial modulador do ritmo circadiano tem adquirido cada vez mais interesse nos estudos científicos, pois seu uso permite sincronizar os relógios biológicos em diferentes tipos de doença.

A luz artificial branca ou luz brilhante é a ferramenta utilizada na terapia de luz ou também chamada de fototerapia. Esta metodologia vem sendo empregada em diferentes condições neurológicas como, Esclerose Múltipla (MATEEN et al., 2017), Doença de Parkinson (VIDENOVIC et al., 2017; WILLIS; MOORE; ARMSTRONG, 2012), Doença de Alzheimer (SEKIGUCHI; IRITANI; FUJITA, 2017) e epilepsia (BAXENDALE; O'SULLIVAN; HEANEY, 2012). A partir destes estudos, observa-se o uso de diferentes protocolos que incluem intensidade de luz entre 4.000 a 10.000 lux, tempo de exposição diária que varia de 30 minutos a 2 horas por dia, podendo ser utilizada na fase clara, escura ou em ambas as fases do dia. Apesar destas diferenças metodológicas aplicadas nos diferentes estudos, pode-se destacar que a fototerapia é um tratamento promissor, pois apresentam características importantes, como a facilidade na aquisição do dispositivo luminoso, o baixo custo, é um tratamento não invasivo e com poucos efeitos colaterais, o que se destaca em relação aos tratamentos farmacológicos e cirúrgicos, por exemplo.

Ao estudar a fototerapia como tratamento para a fadiga associada a Esclerose Múltipla, Mateen e cols (2017) observaram melhoras apresentadas pelos pacientes após a utilização de luz na intensidade de 10.000 lux, por um tempo de exposição de 1 hora, 2 vezes por dia, utilizando a luz tanto na fase clara como na fase escura do período. Na doença de Parkinson foi possível observar melhoras nos sintomas motores e não motores do uso da terapia com luz associada a terapia de reposição de dopamina (WILLIS; MOORE; ARMSTRONG, 2012). O estudo de Videnovic e col (2017) avaliou o efeito da fototerapia sob o sono e a atenção na doença de Parkinson,

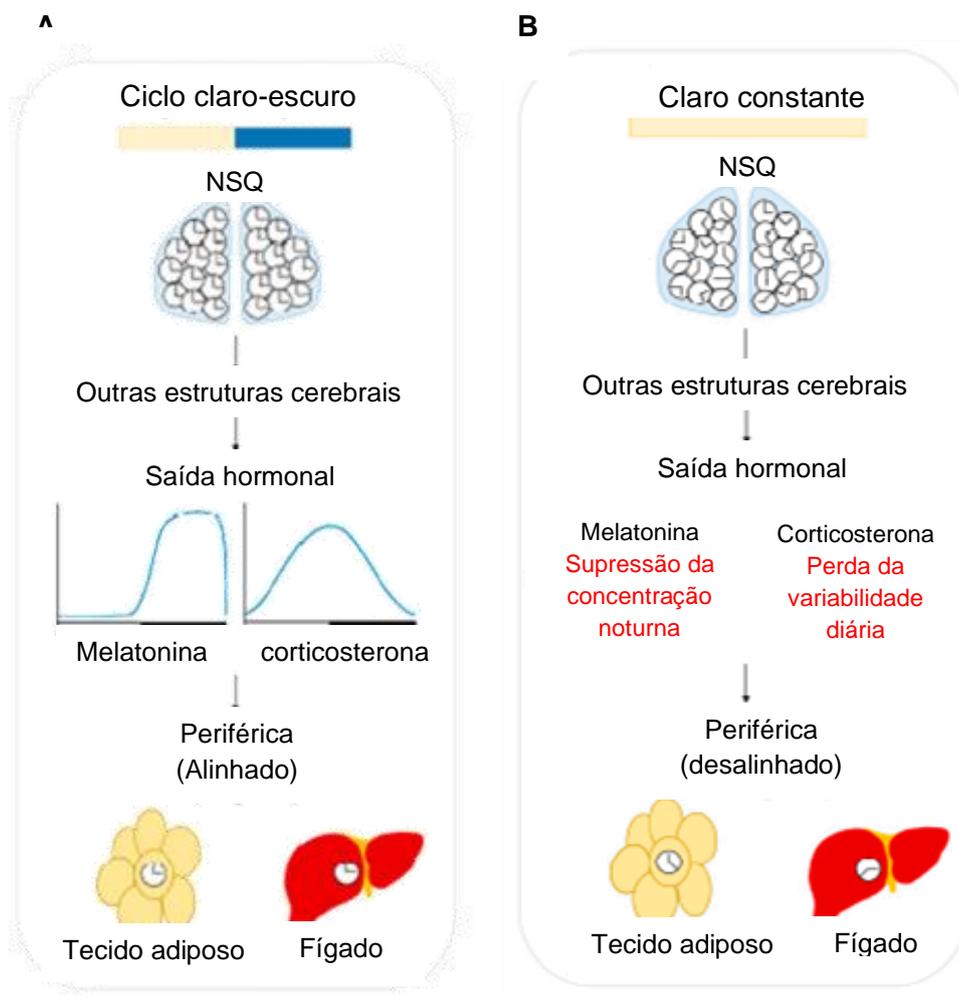
constatou-se que a administração da luz 2 vezes ao dia por 2 semanas, apresenta melhorias na qualidade do sono e no aumento da atividade física, está avaliada por actigrafia. Ao avaliar as crises epilépticas após a fototerapia observa-se redução das crises, independente se a intensidade de luz é alta (10.000 lux) ou baixa (2.000 lux) pois o efeito é semelhante. Os autores observaram que os melhores benefícios da terapia com a luz são encontrados nas epilepsias associadas a formação hipocampal, como no caso da epilepsia do lobo temporal mesial (BAXENDALE; O'SULLIVAN; HEANEY, 2012).

Os mecanismos neurobiológicos ainda são pouco compreendidos no que tange aos benefícios do uso da terapia com luz nas diferentes doenças neurológicas. Mas a principal hipótese que sustenta o tratamento das doenças neurológicas com a luz é a possibilidade de redefinir o ritmo circadiano de alguns eventos biológicos, como a secreção de melatonina (WILLIS; MOORE; ARMSTRONG, 2012), o ciclo sono-vigília (VIDENOVIC et al., 2017) e padrões adquiridos que apresentam oscilação temporal como as crises epilépticas em modelos experimentais (ROBERTS; KEITH, 1994; STEWART; LEUNG, 2003; STEWART; LEUNG; PERSINGER, 2001b; WEISS et al., 1993) e estudos com humanos (CHO, 2012; DURAZZO et al., 2008; MIRZOEV et al., 2012).

A comunidade científica discute sobre as alterações nas informações circadianas geradas e transmitidas pelo relógio central aos osciladores periféricos (*output*), em resposta as mudanças do ambientais, incluindo poluição luminosa, condições de livre-curso, ou mesmo sob fototerapia, um vez que, estas informações alteradas quando transmitidas modulam toda a organização temporal interna. A melatonina e o cortisol são alguns dos sincronizadores endógenos capazes de levar as informações geradas pelos NSQs (oscilador central) para os órgãos periféricos (figura 6 A). Em condições de LL a melatonina é suprimida durante a fase escura (noite subjetiva) e a variabilidade diária do cortisol é perdida. (figura 6 B) (RUMANOVA; OKULIAROVA; ZEMAN, 202). Interessantemente, o cortisol e a melatonina apresentam importante papel na epilepsia, alguns estudos sugerem que a melatonina atenua a excitabilidade cerebral, exercendo atividade anticonvulsivante, tanto em modelos experimentais (LIMA et al., 2011; COSTA-LOTUFO et al., 2002; BOROWICZ et al., 1999), quanto em estudos com humanos (GOLDBERG-STERN et al., 2012; ELKHAYAT et al., 2009), além disso, o padrão oscilatório da melatonina em pacientes

epilépticos adultos apresenta avanço de fase com uma “explosão” na fase escura, além disso observou-se aumento nas concentrações gerais da melatonina (MOLINA-CARBALLO et al., 1994). Já o cortisol, exibe flutuações circadianas diante de períodos de estresse, influenciando na ocorrência das crises epiléticas (VAN CAMPENET al., 2015). Estes achados indicam uma importante relação entre os ritmos circadianos e as doenças neurológicas, especialmente no contexto da epilepsia.

Figura 6 - Os efeitos das diferentes condições de iluminação na organização temporal



(A) A claro-escuro (CE) ciclo fornece uma pista ambiental que aciona relógios individuais no núcleo supraquiasmático (NSQ), que estão em sincronia entre si. Devido ao relógio central, as saídas (outputs) humorais são os osciladores rítmicos e periféricos também são incluídos no ciclo CE. (B). Em claro constante (CC), que é um forte cronodisruptor, ocorre o desacoplamento de relógios individuais no NSQs, resultando em ritmos interrompidos de

saídas humorais (vermelho) e desalinhamento entre relógios periféricos. Fonte: Adaptado de RUMANOVA; OKULIAROVA; ZEMAN, 2020.

1.5 Epilepsia e Ritmo Circadiano

A epilepsia é uma condição do sistema nervoso central caracterizada pela predisposição duradoura em gerar crises epiléticas, decorrente da atividade neuronal excessiva ou síncrona anormal no cérebro (FISHER et al., 2014; NONINO-BORGES et al., 2004). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 50 milhões de pessoas no mundo têm epilepsia, sendo considerada um problema de saúde pública, por tratar-se de um dos problemas neurológicos mais comum no mundo (DEVINSKY et al., 2018; OPAS/OMS, 2018).

Em muitos casos, a etiologia da epilepsia é desconhecida, em outros, as crises podem ser o resultado de quaisquer insultos que perturbem a função cerebral normal (SCHEFFER et al., 2017). No entanto, o diagnóstico clínico é realizado de acordo um conjunto de evidências clínicas e epidemiológicas, sendo o tipo crise epilética o parâmetro mais utilizado na clínica médica. As crises epiléticas podem ser classificadas em: a. crise focal, caracterizada pelo início da atividade neuronal anormal em uma ou mais regiões específicas do cérebro; b. crises generalizadas, em que a atividade neuronal anormal começa em ampla distribuição e em ambos os hemisférios cerebrais; e, c: crises de início desconhecido, para estas crises, os dados clínicos e laboratoriais disponíveis não são capazes de identificar se o início é focal ou generalizado. De acordo com o tipo de crise epilética, somados aos exames de imagens, pode-se pressupor inicialmente qual epilepsia o paciente apresenta. A epilepsia pode ser classificada de acordo com o tipo de crises em: Epilepsias Focais, Epilepsias Generalizadas, Epilepsia com Crises Focais, Generalizadas Combinadas e as Epilepsias Desconhecidas (DEVINSKY et al., 2018).

Dentre as epilepsias, destaca-se a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) que é o tipo mais frequente de epilepsia focal em humanos (ENGEL, 2001). De acordo com a Liga Internacional Contra a Epilepsia (International *League Against Epilepsy*-ILAE), a origem das descargas epiléticas e semiologia das crises, podem ser subdivididas em mesial (ELTM) e lateral (ou neocortical) (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006). Aproximadamente, 60% dos casos correspondem à epilepsia do lobo temporal mesial

(FRENCH et al., 1993), sendo a forma associada à esclerose hipocampal (ELTM-EH) a mais comum, onde cerca de 50-70% dos pacientes são fármacos-resistentes (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006; ENGEL, 2001). Quando o tratamento farmacológico não é bem-sucedido, os indivíduos com ELTM-EH podem ser submetidos à ressecção cirúrgica, pois tem sido relacionada tanto a causa quanto resultado de crises não controladas, sendo uma opção terapêutica. Em torno de 60-80% dos casos, as crises cessam após lobectomia temporal (OLBRICH et al., 2002). Entretanto, 20% dos pacientes continuam apresentando crises (ENGEL, 2001; KOSSOFF et al., 2009). Assim, torna-se necessária a exploração de tratamentos alternativos.

Na ELT, os indivíduos passam por um processo pelo qual o cérebro antes normal torna-se um cérebro epilético, para este evento dá-se o nome de epileptogênese, que se inicia a partir de um insulto precipitante, como traumatismo craniano, uma convulsão febril durante a infância, ou o *Status Epilepticus* (SE). Em seguida, o cérebro progride para a fase de latência, onde ainda não há manifestações comportamentais de crises, caracterizada por mudanças estruturais que estão associadas a uma reorganização celular progressiva em todo cérebro, que inclui perda neuronal, neurogênese, astrogliose, rearranjo neuronal, alterações na expressão gênica e neuroinflamação, principalmente no hipocampo (GITAÍ et al., 2011; SHARMA et al., 2007). A epileptogênese pode evoluir para fase crônica (epilepsia), um período característico da ELTM pela ocorrência de CREs (MATHERN et al., 1996)

Tanto as mudanças estruturais que ocorrem mediante um insulto precipitante, quanto a atividade neuronal anormal ocorrem com destaque na formação hipocampal (foco epileptogênico), uma região do cérebro que apresenta atividades oscilatórias ao longo de 24h (BOUCHARD-CANNON et al., 2013; CHAUDHURY; WANG; COLWELL, 2005; IKENO; WEIL; NELSON, 2013; RAWASHDEH et al., 2014). De fato, além da formação da memória e do processo de aprendizagem que são funções inerente ao hipocampo (RUBY et al., 2008; TAKAHASHI, SAWA e OKADA, 2013; RAWASHDEH et al., 2014), atividades biológicas como neurogênese (TAMAI; SANADA; FUKADA, 2008), controle na densidade dendríticas (IKENO; WEIL; NELSON, 2013), assim como potenciação de longa duração (CHAUDHURY; WANG; COLWELL, 2005;

O'CALLAGHAN et al., 2012) apresentam oscilação ao longo do dia no hipocampo. Pressupondo assim, que o hipocampo apresenta um papel fundamental na ritmicidade de eventos biológicos importantes na fisiopatologia da epilepsia, sendo considerado a região de interação entre as crises e o ritmo circadiano (CHAUDHURY; WANG; COLWELL, 2005).

As evidências sugerem interação entre a ELT com o sistema circadiano, devido ao padrão oscilatório das crises epiléticas (ARIDA et al., 1999; BERTRAM; CORNETT, 1994; CAVALHEIRO et al., 1991; MATZEN; BUCHHEIM; HOLTKAMP, 2012; MIRZOEV et al., 2012; QUIGG et al., 2000; TCHEKALAROVA et al., 2010, 2011; VAN NIEUWENHUYSE et al., 2015) e a influência do ritmo circadiano na susceptibilidade as crises (ROBERTS; KEITH, 1994; STEWART; LEUNG, 2005; STEWART; LEUNG; PERSINGER, 2001b; WEISS et al., 1993; YEHUDA; MOSTOFISKY, 1993). Além do mais, as CREs podem interferir na oscilação de outros ritmos biológicos, como na atividade-reposo (MATOS et al., 2018; STEWART; LEUNG, 2003), temperatura corporal (QUIGG et al., 1999), níveis circulantes de hormônios (VAN CAMPEN et al., 2015; YALÝN et al., 2006). A partir de estudos com ELT, tanto em animais como em humanos, é possível observar que as crises ocorrem preferencialmente durante o estado de vigília. Alguns estudos observaram o pico das CREs em um único momento do dia (unimodal) ou em dois momentos (bimodal) ao longo de 24h (KALEYIAS et al., 2011; MIRZOEV et al., 2012; NZWALO et al., 2016). Em modelo experimental de ELT, a gravidade das crises é influenciada pela fase do dia em que a indução do *Status Epilepticus* (SE) ou de crises agudas são realizadas (ROBERTS; KEITH, 1994; STEWART; LEUNG, 2005; STEWART; LEUNG; PERSINGER, 2001a; WEISS et al., 1993; YEHUDA; MOSTOFISKY, 1993).

Apesar das evidências sobre a interação entre epilepsia e o ritmo circadiano, pouco é sabido sobre os mecanismos associados a esta interação bidirecional. Este estudo busca contribuir no entendimento das lacunas existentes na literatura. Além disso, estudos desta natureza podem ajudar na compreensão do controle das crises epiléticas por um sistema circadiano, promover o conhecimento da própria fisiopatologia da epilepsia, uma condição neurológica pouco compreendida, mas também para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do ritmo circadiano alterado no processo epileptogênico.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o ritmo de atividade locomotora espontânea (ALE) em animais mantidos em ciclo claro-escuro (CC) e em condições de claro constante (CC);

- Avaliar o efeito da CC nas crises agudas durante o *Status Epilepticus* (SE);

- Avaliar a evolução temporal das crises recorrentes e espontâneas (CREs);

- Avaliar o efeito da CC nas CREs;

- Avaliar o padrão temporal das CREs de animais mantidos em condições CE e CE

- Avaliar o ritmo de ALE em animais epiléticos submetidos em condições de CE e CC

2.1 Animais

Neste estudo foram utilizados 92 ratos machos *Wistar*, oriundo Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN/UFAL). Os animais utilizados tinham entre 90 e 100 dias, pesando 300-350g, foram mantidos no biotério setorial do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM). Inicialmente os animais foram mantidos em grupos de quatro animais por gaiola, a uma temperatura controlada de 22°C, comida e água *ad libitum*. A princípio todos os animais foram submetidos a ciclos de 12h/12h claro-escuro (as luzes eram acesas às 6h e desligadas às 18h).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, sob o número de protocolo 20/2018 (Anexo 01), vinculado ao Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CNS/MS/Brasil), baseado em normas internacionais (Declaração Universal dos Direitos do Animal, UNESCO, 15/10/1978) e nacionais (Lei 6.638 de 08/05/1979).

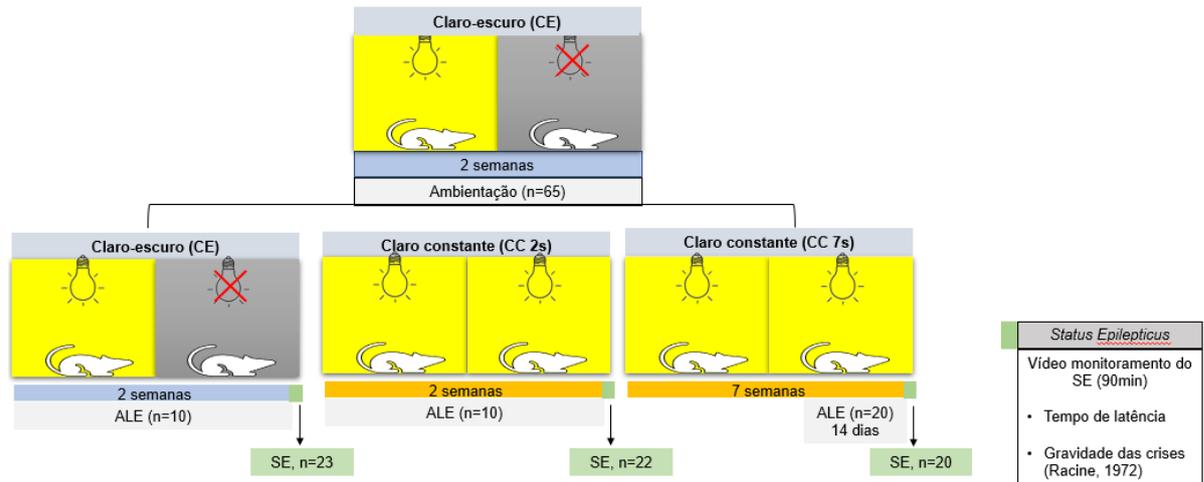
2.1.1 Delineamento experimental

Inicialmente todos os animais foram ambientados no biotério setorial do LBCM, por 14 dias em ciclos normais de 12h de claro e 12h de escuro, as luzes eram acesas as 6h (ZT 12) e apagadas às 18h (ZT 24). Após o período de ambientação os animais foram alocados em gaiolas individuais e distribuídos em grupos experimentais

2.1.1.1 Experimento 1

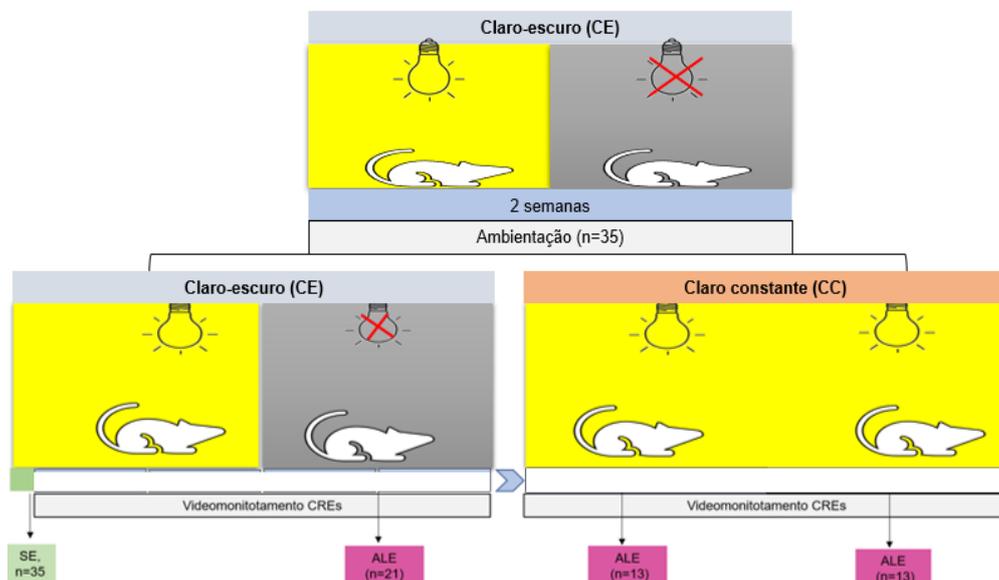
Após o tempo de ambientação os animais foram (n=65) alocados em gaiolas individuais e distribuídos em grupos experimentais. Grupo Claro-Escuro (CE, n=22): animais mantidos em ciclo CE, submetidos ao registro de atividade locomotora (ALE) por 14 dias (2 semanas). Grupo claro constante 2 semanas (CC 2s): animais mantidos em luz constante por 2 semanas. Concomitante a submissão dos animais a CC os animais foram mantidos no sistema ALE por 14 dias. Grupo claro constante 7 semanas (CC 7s): Animais mantidos a CC por 7 semanas. Durante os 14 últimos dias os animais foram submetidos ao registro de ALE. Após o registro do ritmo de atividade repouso todos os animais foram submetidos ao SE, sendo as crises avaliadas durante o SE.

Figura 7 - Experimento 1 grupos controles e agudos



Inicialmente todos os animais (n=65) foram ambientados, por duas semanas em ciclos normais de 12h de claro e 12h de escuro, as luzes eram acesas as 6h e apagadas às 18h. Após o período de ambientação os animais foram alocados em gaiolas individuais e distribuídos em grupos experimentais. Grupo Claro-Escuro (CE): animais mantidos em ciclo CE, submetidos ao registro de atividade locomotora (ALE) por 14 dias (2 semanas). Grupo claro constante 2 semanas (CC 2s): animais mantidos em claro constante por 2 semanas. Concomitante a submissão dos animais a CC os animais foram mantidos no sistema ALE por 14 dias. Grupo luz constante 7 semanas (CC 7s): Animais mantidos a CC por 7 semanas. Durante os 14 últimos dias os animais foram submetidos ao registro de ALE. As induções do *Status epilepticus* (SE) de todos os animais foram realizadas as 8-9h da manhã. Fonte: Autora, 2020.

Figura 8- Experimento 2 grupos epiléticos



Todos os animais (n=35) foram ambientados, por duas semanas em ciclos normais de 12h de claro e 12h de escuro, as luzes eram acesas as 6h e apagadas às 18h. Após o período de ambientação os animais foram alocados em gaiolas individuais e videomonitorados. Após o estabelecimento das CREs, um mês após o SE, os animais (n=21) foram videomonitorados nos seguintes períodos: 5 semanas após o SE (9 dias), 7 semanas após o SE (14 dias) e 9 semanas após o SE (10 dias). O registro de ALE foi realizado entre a 7ª e 9ª semanas após o SE (n=21, por 10 dias). Logo após o término das análises das CREs durante o ciclo CE, todos os animais foram mantidos em claro constante (n=21). Logo que se iniciou o tratamento com CC os animais foram videomonitorados por 14 dias (n=8) e foram submetidos ao registro da ALE (n=13). Sete semanas após o início da CC, as CREs dos ratos foram monitoradas (n=13) e foi realizada a avaliação da ALE (n=13). Fonte: Autora, 2020.

2.1.1.1 Experimento 2

Após o tempo de ambientação todos os animais foram submetidos ao SE (n=35). Duas semanas após o SE um grupo de animais foram videomonitorados (n=14) para avaliação da gravidade e da ritmicidade das CREs. Após o estabelecimento das CREs, um mês após o SE, os animais (n=21) foram videomonitorados nos seguintes períodos: 5 semanas após o SE (9 dias), 7 semanas após o SE (14 dias) e 9 semanas após o SE (10 dias). O registro de ALE foi realizado entre a 7ª e 9ª semanas após o SE (n=21, por 10 dias). Logo após o término das análises das CREs durante o ciclo CE, todos os animais foram mantidos em claro constante (n=21). Logo que se iniciou o tratamento com CC os animais foram videomonitorados por 14 dias (n=8) e foram submetidos ao registro da ALE (n=13). Sete semanas após o início da CC, as CREs dos ratos foram monitoradas (n=13) e foi realizada a avaliação da ALE (n=13). O videomonitoramento das CREs e o registro da ALE foram realizados durante 24h por dia.

2.2 Indução do *Status epilepticus* (SE).

Todos os animais dos grupos epiléticos (Epi – CE e Epi - CC) e agudos (CE – SE, CC 2s - SE e CC 7s - SE) foram submetidos a indução do SE, pelo método Lítio-Pilocarpina (Li-PILO). Inicialmente, administrou-se a injeção i.p. de Cloreto de Lítio (127 mg/kg), 18-24 hora antes da administração i.p. de PILO de 30mg/kg. Para limitar os efeitos periféricos da administração de PILO, foram injetados, 30 minutos antes da injeção da PILO, o butilbrometo de escopolamina (1mg/kg, i.p). Todas as induções foram realizadas na fase clara do dia (8-9h da manhã - ZT14 e ZT15).

Logo após a administração de PILO, os animais foram videomonitorados, com o auxílio de uma filmadora digital (DCR-SR68, Sony Brasil LTDA), durante 90 minutos, período de duração do SE. Para a caracterização do início do SE, o critério utilizado foram a ocorrência de crises contínuas que se sustentassem durante o tempo mínimo de cinco minutos após a injeção de PILO (LOWENSTEIN e ALLDREDGE, 1998 e SHORVON, 1994). Após uma hora de SE foi realizada a reposição hidroeletrólítica através da injeção intraperitoneal de soro fisiológico a 0,9% (1ml para cada animal). Para a reversão do SE, os animais foram tratados com diazepam (5 mg/kg) via intraperitoneal após período de 90 minutos, a dose de diazepam foi repetida a cada 30min até que o SE fosse revertido completamente.

2.3 Avaliação das crises do *Status Epilepticus*

O SE foi gravado para a avaliação e classificação das crises. Os 90 min de SE foram divididos em 18 janelas de 5 minutos cada e as crises epiléticas dos animais em cada janela foram classificadas de acordo com a escala de crises límbicas estabelecida por Racine (1972) e representada na Tabela 2.

Tabela 2- Escala comportamental de crises límbicas de Racine

0 - Imobilidade
1 – Automatismos faciais
2- Mioclonias de cabeça
3- Clonias uni ou bilaterais de patas anteriores
4- Clonias de patas anteriores com elevação sobre as patas posteriores
5- Elevação das patas anteriores e queda atônica com crises clônicas generalizadas

Fonte: RACINE, 1972.

Para a análise das crises convulsivas, as seguintes variáveis foram avaliadas: latência para o SE [tempo (seg.) transcorrido entre a injeção de pilocarpina e a crise convulsiva epiléptica continuada, característica do SE] e a frequência relativa das crises nível 2, 3, 4 e 5 durante o SE. A crise de nível 2 denominamos como crises focais, quanto as crises nível 3, 4 e 5 foram definidas como crises generalizadas.

2.4 Avaliação das Crises Recorrentes e Espontâneas (CREs)

Para avaliar o perfil temporal das CREs foram utilizadas as crises durante a fase crônica observadas e classificadas utilizando a escala de Racine (tabela 1). A latência representa o tempo entre o fim do SE e o início para a primeira CREs. Em estudo realizado por Pitsch e col (2017) observou-se que as crises ocorridas logo após SE representam um resquício da Pilocarpina utilizada para indução do SE, não representado, dessa forma, uma CRE. Sendo assim, determinou-se, para este estudo, que o tempo de latência seria contado a partir do 7º dia pós SE. De cada crise observada, levou-se em consideração o maior nível atingido pelo animal durante a crise em questão. A severidade das CREs foi considerada as crises de nível 3, 4 e 5.

2.5 Registro de Atividade Locomotora Espontânea (ALE)

Os animais foram ambientados individualmente em caixas medindo 37 x 24,2 x 24 cm durante 10-14 dias. Cada caixa ficou isolada das demais e possuía um sensor infravermelho localizado cerca de 15cm acima da tampa. Os sensores detectaram todas as movimentações dos animais dentro das caixas e o registro foi enviado ao computador a cada 5 minutos pelo sistema SAP (Dr. Marconi Camara Rodrigues, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil, 2011).

2.6 Análise da ritmicidade circadiana das Crises Recorrentes e Espontâneas (CREs) e da atividade locomotora espontânea (ALE)

O MetaCycle, pacote R que incorpora ARSER, JTK_CYCLE e Lomb-Scargle para avaliar a periodicidade em dados de séries temporais, foi realizado para análise do perfil temporal das CREs e atividade locomotora espontânea ao longo de 24 horas. O resultado do MetaCycle continha o valor p, o período e a amplitude relativa (rAMP).

Foi considerado rítmico quando $p < 0,05$. Para análise temporal das CREs, foi necessário agrupar o número total de crises de todos os animais, e colapsar dos dados em 2 ciclos (Meta 2d).

Para elaboração do Actograma da ALE foi utilizado o software ImageJ. Para a construção dos gráficos das CREs ao longo do dia foram utilizados os softwares CircWave (curva) e o GraphPad Prism (Histograma).

2.7 Análises estatísticas

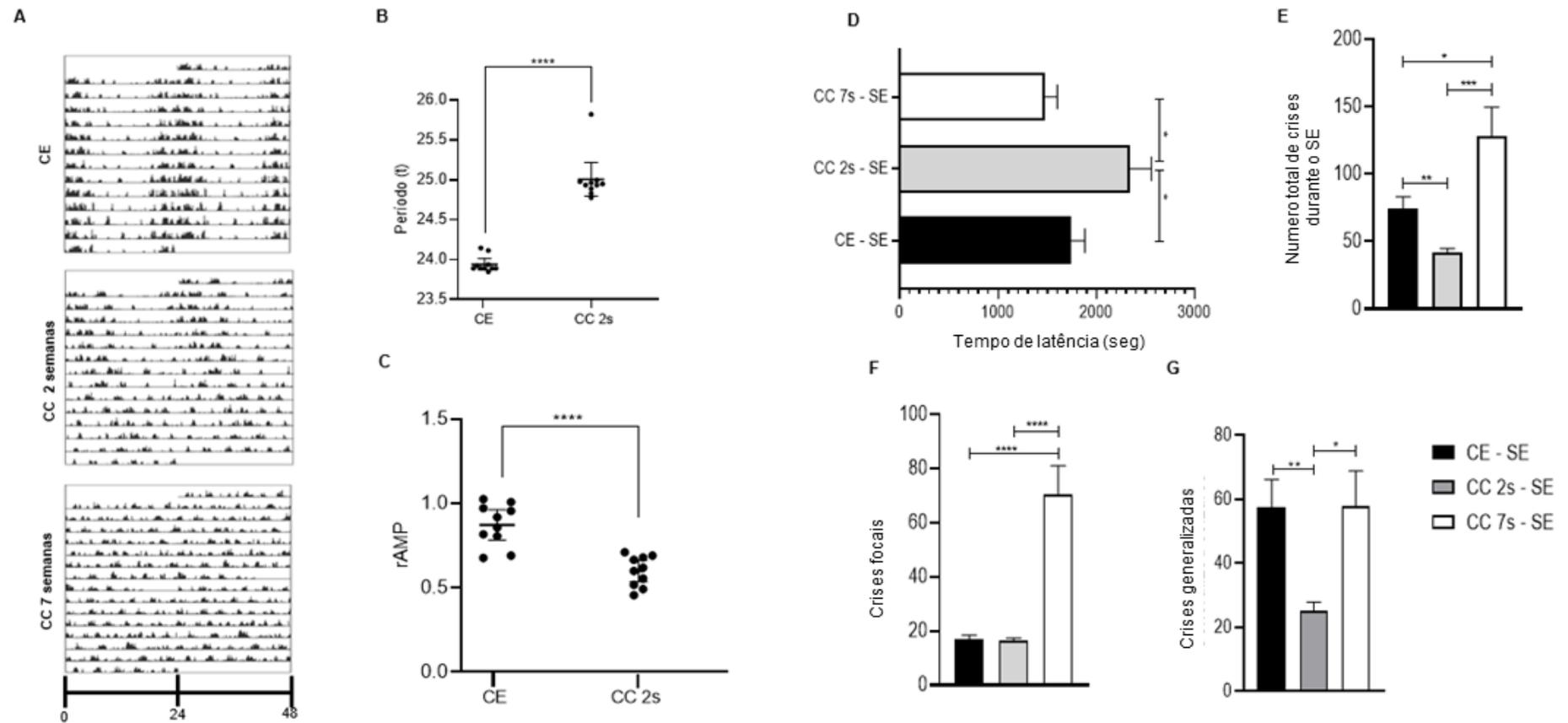
Para avaliação das crises durante o SE e das CREs (Latência, total de crises/CREs e severidade das crises, assim como para as variáveis do ritmo, foi utilizado o software *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software, La Jolla, CA). Todos os dados que assumissem distribuição normal a partir da avaliação do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, em seguida realizava-se o teste de variância simples (ANOVA), seguida por teste Bonferroni ou Dunnett quando realizadas comparações múltiplas. Quando um único parâmetro foi comparado entre dois grupos diferentes, o teste *t* Student foi empregado. Sendo as amostras não paramétricas, realizava o teste Kruskal-Wallis para múltiplas comparações. Quando se tratava de apenas dois grupos optou-se em utilizar o teste *t* Mann-Whithy. Os dados estão representados como a média \pm erro padrão (\pm EPM) de pelo menos quatro experimentos independentes. $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ foram considerados significativos.

3.1 Efeito da luz constante sobre o ritmo da ALE e das crises agudas durante o Status Epilepticus (SE)

Todos os animais submetidos ao ciclo CE mantiveram a ritmicidade circadiana da ALE, com período $23.94 \pm 0.03h$ e $rAMP$ de 0.87 ± 0.03 (figura 9A -C). Enquanto, os animais expostos a CC por duas semanas apresentaram aumento significativo no período ($25.01 \pm 0.09h$, $p < 0.0001$) e menor $rAMP$ (0.59 ± 0.028 , $p=0.007$) em relação ao grupo controle. O ritmo de ALE foi abolido em todos os animais expostos a LL por 7 semanas, impedindo que as medidas do ritmo fossem estabelecidas. É possível observar nos actogramas representativos (figura 9A) que os animais expostos a LL apresentam maior fragmentação do ritmo de ALE em relação ao grupo controle, sendo ainda mais instável e fragmentado o animal LL 7 semanas.

Para a caracterização do início do SE, o critério utilizado foi a ocorrência de pelo menos uma crise de nível ≥ 3 da escala de Racine, além da presença de crises contínuas que se sustentassem durante o tempo mínimo de cinco minutos após a injeção de Pilocarpina. Conforme observa-se na figura 9D, o tempo de latência foi maior, de forma significativa, nos animais LL 2s - SE (2341 ± 218.9 seg), quando comparado aos grupos LD - SE (1743 ± 141.8 seg, $p=0,034$) e o LL 7s- SE ($1473 \pm 130,6$ seg, $p=0,019$). Estes resultados mostram que os animais mantidos em claro constante por menor tempo, 2 semanas, tiveram um tempo de latência mais prolongado. E quando o tempo de exposição a luz constante é maior, como no caso do grupo LL 7s - SE, o tempo de latência se equipara aos animais mantidos em condições normais de claro/escuro, revelando não ter efeito significativo.

Figura 9 - Efeitos da exposição contínua à luz na atividade locomotora e variáveis convulsivas durante o SE.



(A) Três atograma representativo de dupla plotagem da atividade locomotora para controle e dois ratos sob o ciclo CC; (B) Os grupos controle e CC por 2s mantiveram o ritmo circadiano do ciclo repouso-atividade, porém houve aumento do período circadiano do grupo exposto ao CC por 2 semanas. Após 7 semanas em CC, o ritmo de 24 horas é perdido e as medições do ritmo circadiano não podem ser estabelecidas; (C) Amplitude relativa (rAMP), o grupo CC 2s apresenta ritmo mais fragmentado, representado pelo menor rAMP; (E) Latência para o início do *status epilepticus* após exposição ao claro constante

Continuação: Animais mantidos no claro constante por 2 semanas têm maior tempo de latência para o início do SE, em comparação aos grupos controle e CC de 7 semanas; (E) O número total de apreensões durante o SE. CC 2s diminuiu a incidência de convulsão durante SE em comparação com os grupos de controle e CC 7 semanas; (F, G) o número de crises focais (estágio 2) e crises generalizadas (estágio 3,4 e 5), os animais expostos a CC por 2 semanas têm menos crises generalizadas em comparação aos grupos controle e CC 7 semanas, dando proteção durante SE. Os dados são expressos como média \pm SE ou média com intervalo de confiança de 95%. O teste estatístico para análise circadiana foi feito por MetaCycle. As comparações entre as condições foram feitas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney de medidas repetidas ou teste t paramétrico, * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001. Fonte: Autora, 2020.

Para as análises de gravidade de crise, os 90 minutos de SE foi dividido em 18 janelas de 5 minutos, cada. O padrão dos níveis de gravidade de crises para cada grupo experimental durante o SE foi observado e classificado de acordo com a escala de Racine. Na figura 9 E, pode-se observar que os animais mantidos em claro constante por duas semanas tiveram uma redução significativa de 56% ($41,64 \pm 3,24$) no número total de crises comparadas ao grupo CE – SE ($74, 47 \pm 8,7$, p= 0,001). Interessantemente, os animais expostos por 7 semanas a LL, apresentaram um aumento de 72% ($128,3 \pm 21,5$) no total de crises em relação ao grupo CE -SE (p= 0,0002).

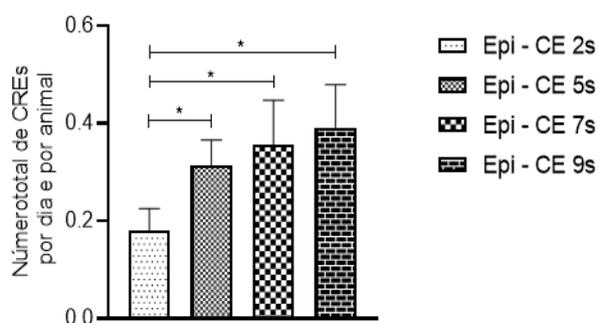
Para melhor avaliar o efeito do claro constante na severidade das crises durante o SE, optou-se em analisar as crises focais (nível 2) separadas das crises generalizadas (nível 3, 4 e 5). Na figura 9F-G, pode-se observar que os animais do grupo CC 7s - SE apresentam maior número crises do tipo focal em comparação ao grupo CE – SE (p<0.0001) e CC 2s- SE (p<0.0001). Não houve diferença significativa entre os grupos CE – SE e o grupo CC 2s - SE. A incidência das crises do generalizadas foi menor no grupo CC 2s – SE em relação aos grupos CE -SE (p=0.001) e CC 7s – SE (p=0.04). O conjunto de dados sugere que a exposição ao claro constante por 2 semanas protege os animais contra as crises mais graves durante o SE, no entanto este achado é perdido quando os animais permanecem por um tempo mais prolongado em livre curso (7 semanas no CC).

3.2 A evolução temporal das crises espontâneas e recorrentes (CREs) e os efeitos da exposição da luz constante na CREs

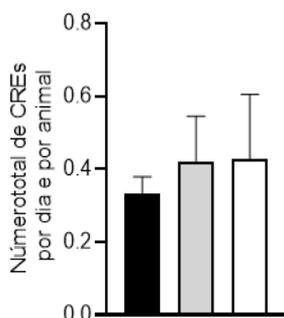
O critério utilizado para definir as CREs foi a ocorrência de pelo menos duas crises de nível 3, com base na classificação de Racine (1972). As CREs foram registradas 24h por dia ao longo do estudo. Na figura 10A, é observado um aumento dependente do tempo na atividade convulsiva 7 dias após a indução do SE, em animais mantidos no ciclo claro-escuro (Epi - CE). O tratamento de CC por duas ou 7 semanas realizado em animais epiléticos não alterou a gravidade das CREs nas comparações antes e depois do tratamento (Figura 10B-C).

Figura 10 - Evolução temporal das crises espontâneas e recorrentes (CREs) e efeito da luz constante na CREs.

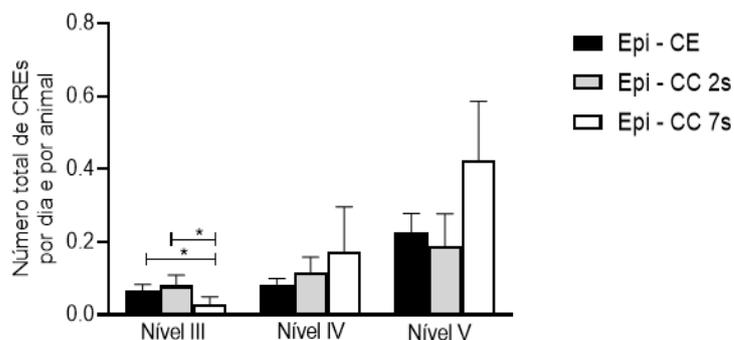
A



B



C



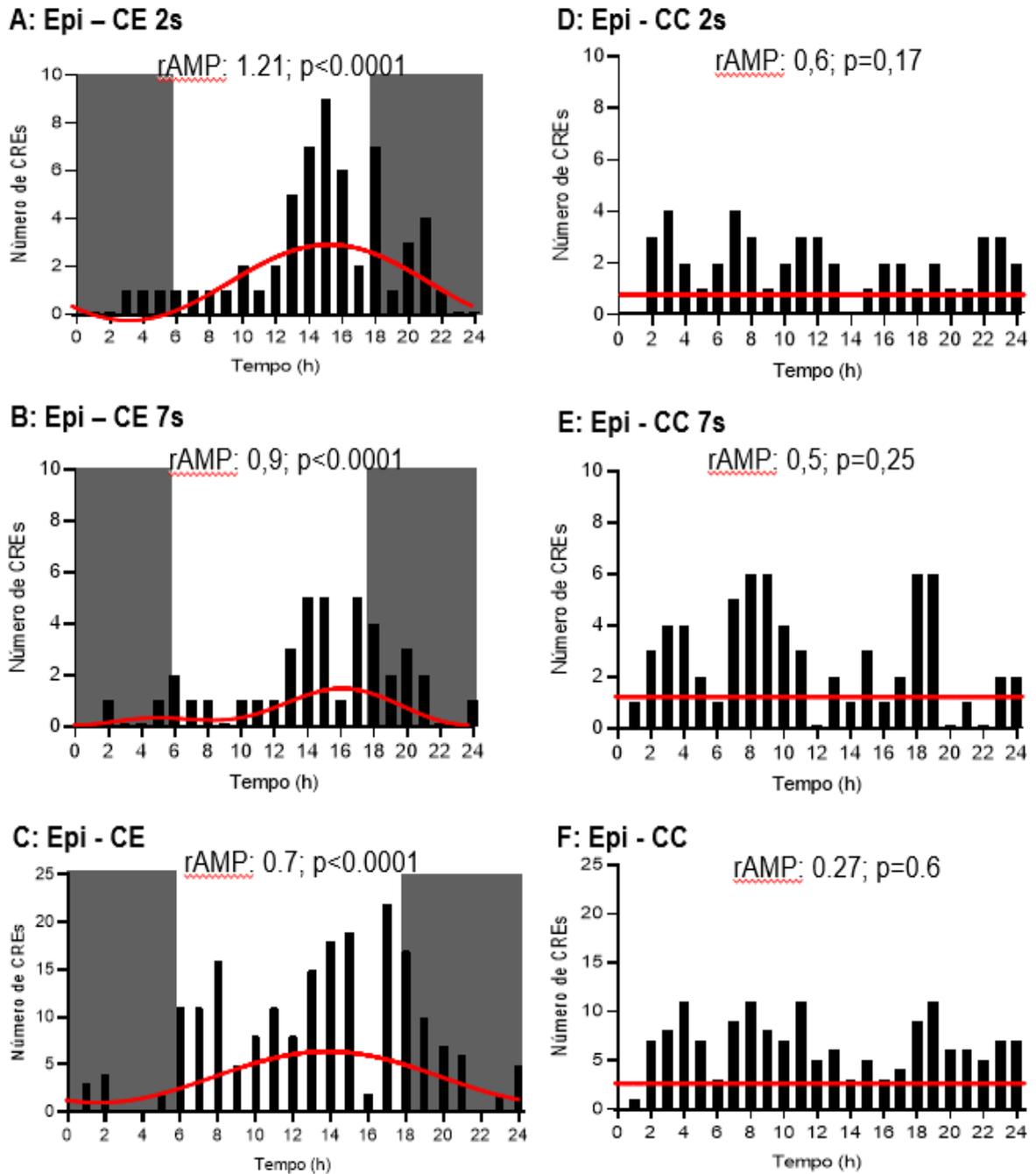
(A) Aumento dependente do tempo na atividade convulsiva 2 semanas após a indução de SE por Li-Pilo, em animais mantidos em um ciclo claro-escuro (LD). Foi observado um aumento progressivo da CREs ao longo do tempo. As barras representam a média \pm SEM; (B, C) Não houve diferença significativa entre os animais expostos a diferentes períodos de tempo a LL em relação ao grupo LD -

Epi. Os dados são expressos como média \pm SEM. As comparações entre as condições foram feitas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney de medidas repetidas ou teste t paramétrico, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Fonte: Autora, 2020.

3.3 Estudo da periodicidade das Crises recorrentes e espontâneas (CREs)

Conforme ilustrado na figura 11A-C, foi constatado oscilação circadiana no perfil temporal das CREs dos grupos de animais submetidos ao ciclo CE, independentemente do tempo de análise. A incidência de convulsões foi predominante durante a fase de clara do dia, quando os animais estavam menos ativos, o que foi evidente nos grupos Epi- CE 2 semanas pós-SE (Figura 11A), Epi- CE 7 semanas pós-SE (Figura 11B), e no conjunto de dados a partir da 5 semana pós-SE (Figura 11C). Notavelmente, a frequência da atividade de CREs atingiu o pico entre o ZT20 e ZT 24, que correspondem aos 14h e 18h, respectivamente, em todos os grupos de Epi – CE (Figura 11 A-C). Em contraste, as CREs apresentadas pelos animais submetidos ao CC, independente do tempo, não apresentam periodicidade de 24 horas.

Figura 11 - Periodicidade de 24 horas das crises espontâneas e recorrentes (CREs) no ciclo claro-escuro (CE) e em claro constante (LL).



(A-C) As CREs dos animais mantidos em ciclo CE; (A) CREs a partir de 2 semanas após o SE; (B) CREs 7 semanas após SE; (C) CREs 5 semanas após SE, por 30 dias consecutivos. (E-G) CREs dos animais mantidos em CC; (E) CREs durante 2 semanas em CC; (F) CREs a partir de 7 semanas em CC; (G) CREs durante 7 semanas em CC, por 30 dias consecutivos. Para os grupos CC, o ritmo de 24 horas do CREs é perdido. Observe que a ocorrência das CREs nos grupos CE atinge o pico

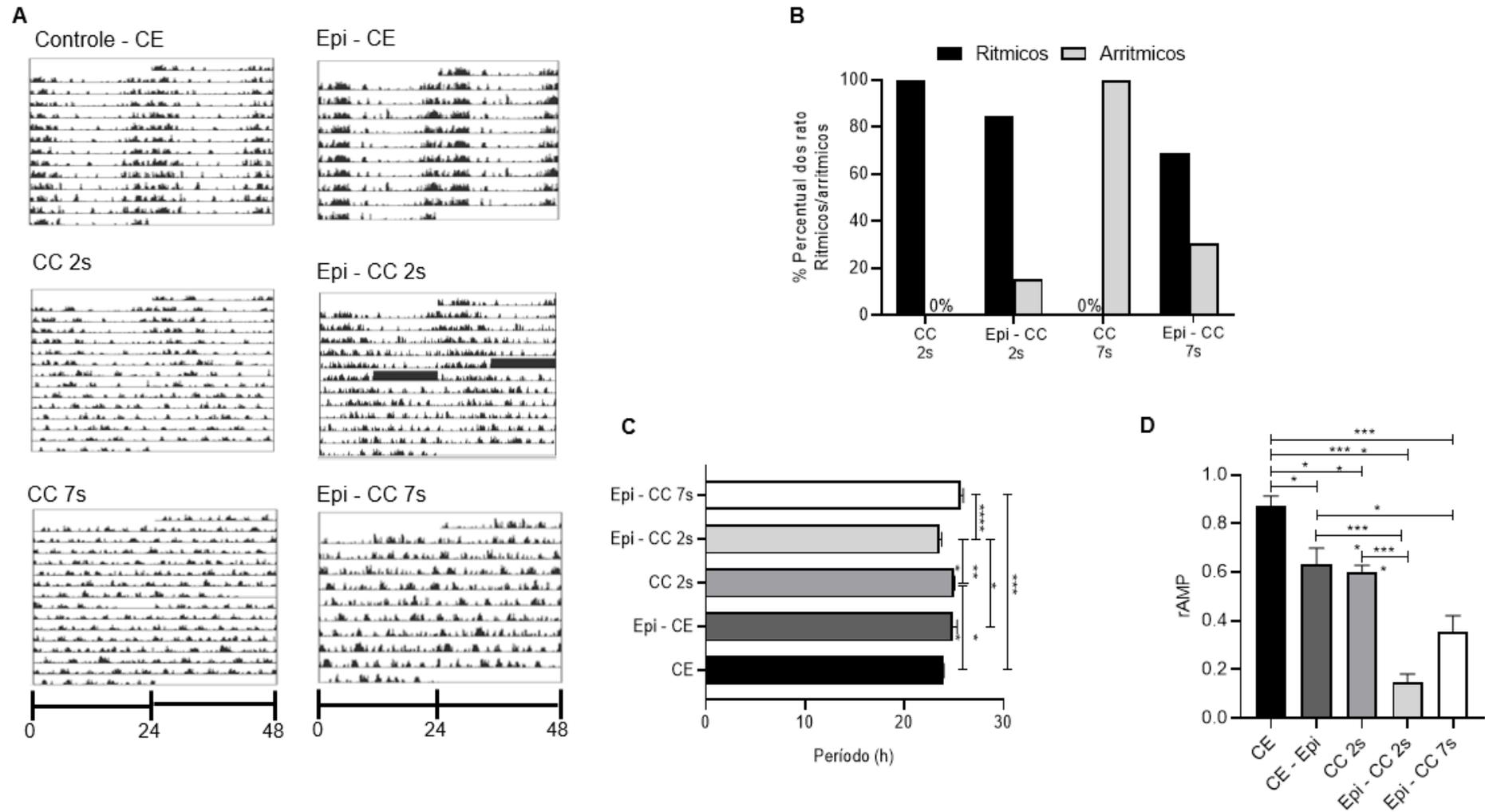
durante o dia e diminui à noite. O teste estatístico para análise circadiana foi feito por MetaCycle no pacote R a função Meta2d. O grupo foi considerado rítmico quando $p < 0,05$. Fonte: Autora, 2020.

3.4 Estudo do ritmo circadiano da Atividade Locomotora Espontânea (ALE)

Todos os animais epiléticos submetidos ao ciclo CE (Epi -CE) mantiveram a ritmicidade circadiana da ALE, com período semelhante ao grupo controle (CE) ($23.94 \pm 0.03h$) (Figura 12 A-C). Interessantemente, a porcentagem de animais rítmicos e arrítmicos submetidos a CC variou conforme a condição estudada (normais e epiléticos) e o tempo de exposição ao CC (Figura 12 B). No grupo LL 7s 100% dos animais perdem o ritmo circadiano para ALE, no grupo Epi - CC 2s 15.4% e no grupo Epi - CC 7s 30.7 % perdem o ritmo de 24 horas (Figura 12 B). Curiosamente, somente uma parcela dos animais do grupo Epi-LL 2s (15.4%) evolui para a arritimicidade, no entanto, todos os animais normais expostos por duas semanas a CC (CC 2s) mantiveram o ritmo circadiano da ALE.

Para o estabelecimento das medidas do ritmo circadiano, como período e rAMP, somente foram utilizados os dados de animais rítmicos. Na figura 1C, é possível observar que os grupos de animais submetidos ao CC apresentaram alterações no período ritmo para ALE. Apesar de não ser observado no grupo CC 2s animais arrítmicos, estes manifestam aumento de período (LL 2s: $25.01 \pm 0.09h$) em relação ao grupo controle-CE ($23.94 \pm 0.03h$, $p=0.0071$). Ao passo que, duas semanas a CC em animais normais ocorre aumento no período ($25.01 \pm 0.09h$), os animais Epi – 2s ($23.55 \pm 0.21h$) apresenta redução significativa no período em relação aos grupos Epi – CE ($24.91 \pm 0.43h$, $p=0.022$), CC 2s ($25.01 \pm 0.09h$, $p=0.0003$), Epi – 7s ($25.65 \pm 0.3h$, $p<0.0001$), sendo semelhante ao grupo CE

Figura 12 - Efeitos da exposição à luz constante na atividade locomotora.

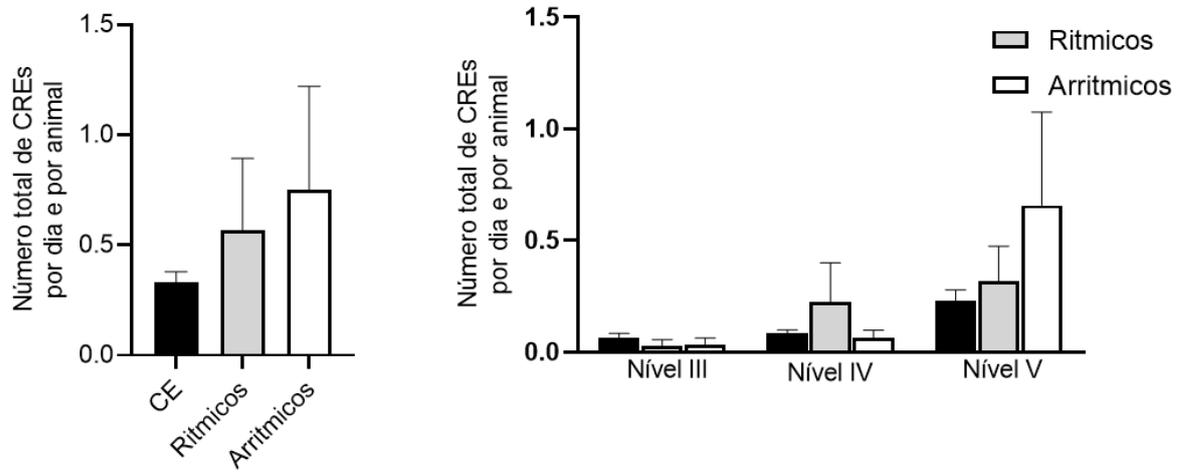


(A) Actograma representativo de plotagem dupla da atividade locomotora em animais normais e epiléticos mantidos no ciclo claro-escuro (CE) ou em claro constante (CC); (B) Porcentagem de animais rítmicos e arrítmicos ao longo do tempo em CC. Os grupos Controle, CE-Epi CC por 2 semanas mantêm o ritmo circadiano do ciclo de atividade em repouso. No entanto os grupos mantidos CC por 7 semanas 100%, Epi - CC 2 semanas 15.4%, Epi - CC 7 semanas 30.77 % perderam o ritmo de 24 horas; Só foi possível estabelecer as medidas do ritmo circadiano dos animais que permaneceram rítmicos. Observe que, todos os animais do grupo CC 7 semanas são arrítmicos; (C) O período foi menor que 24h nos ratos Epi - CC 2 semanas em comparação com os ratos CC 2 semanas, CE-epi, Epi - CC 7 semanas e CC 14 semanas. Porém, o grupo de animais que permaneceram expostos ao CC por mais tempo (Epi - CC 7 semanas) tiveram um aumento no período em relação ao grupo controle.; (D) Amplitude relativa (rAMP), observe que os animais do grupo Epi – CC por 2 semanas que permaneceram rítmicos, apresentando um ritmo menos robusto, mais fragmentado, representado pelo rAMP inferior; Os dados são expressos como média \pm EP. O teste estatístico para análise circadiana foi feito por MetaCycle no pacote R a função Meta2d. O grupo foi considerado rítmico quando $p < 0,05$. Em seguida, as comparações entre as condições foram feitas usando a ANOVA, seguida pelo teste post hoc de Bonferroni ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post hoc de Dunn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Fonte: Autora, 2020

A rAMP descreve a robustez do ritmo, quanto maior o valor mais estável e robusto é o ritmo analisado. Na figura 12 D, observa-se diminuição na rAMP dos grupos expostos ao CC, sendo menos estáveis e mais fragmentos que o grupo control, conforme ilustrado nos actogramas representativos, na figura 4A. É interessante observar a redução significativa do rAMP no grupo Epi – CC 2 weeks (0.14 ± 0.031), em relação aos demais grupos experimentais. Na figura 13 é possível observar que apesar do aumento no número total e na maior gravidade das CREs entre os animais rítmicos e arrítmicos do grupo de animais mantidos por 7 semanas em CC, não houve diferença estatística. O conjunto de dados, relativo ao ritmo de ALE, retrata a disrupção no ritmo circadiano em animais expostos a CC

Ao avaliar as CREs dos animais epiléticos que mantêm o ritmo circadiano, observou-se a ocorrência de crises generalizadas tônico-clônicas (CGTC), sendo 20.8% e 1,5% das CGTC no grupo duas e 7 semanas em CC, respectivamente.

Figura 13. Avaliação das CREs em animais ritmicos e arritmicos.



Não houve diferença significativa entre os animais Epi – LD, ritmicos e, arritmicos expostos 7 semanas em LL. Os dados são expressos como média \pm SEM. As comparações entre as condições foram feitas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney de medidas repetidas ou teste t paramétrico, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Fonte: Autora, 2020.

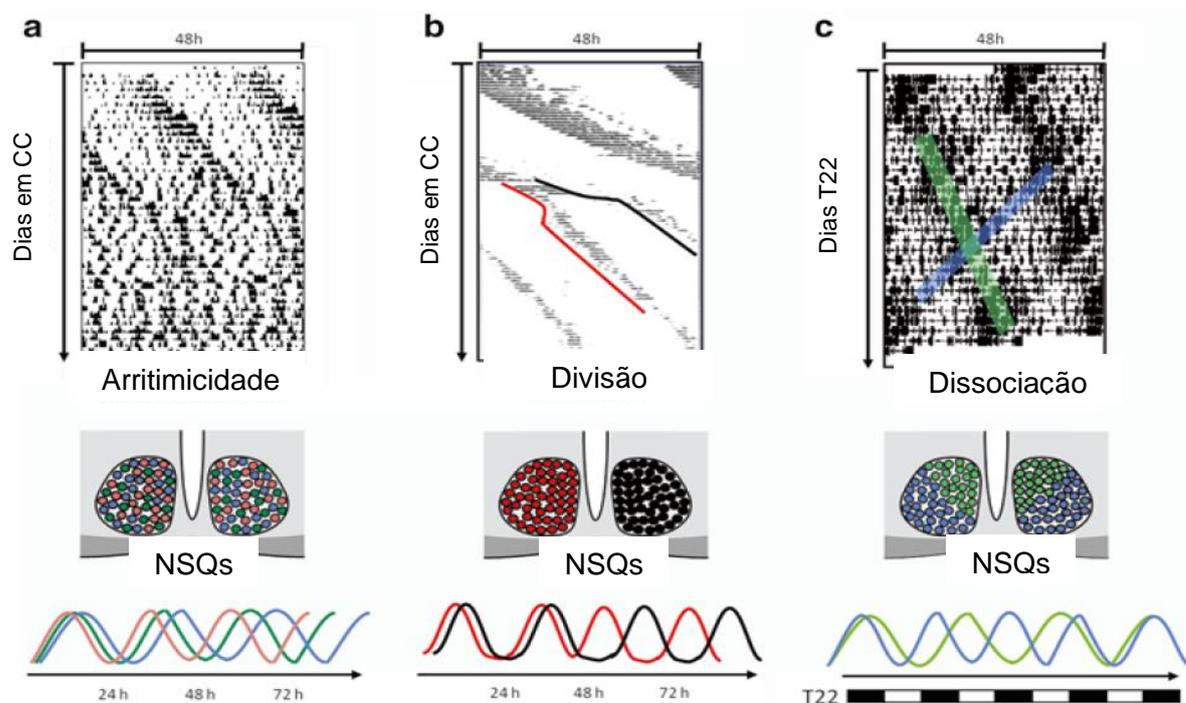
4.1 Efeito da exposição à Luz constante sobre a ALE e as crises agudas durante o SE.

Considerando o impacto da luz nos ritmos biológicos, o presente estudo avaliou o padrão temporal do ALE em animais expostos ao claro constante (CC) por duas ou 7 semanas. Foi observado que os animais expostos por um longo prazo ao CC (7 semanas) o ritmo da ALE foi abolido. Diferentemente, os animais mantidos por um prazo mais curto (2 semanas), o ritmo da ALE sofreu aumento no período e maior fragmentação, mas o ritmo se manteve (Figura 9 A - C). Estes achados corroboram com a literatura, mostrando que em condições de livre-curso induzido pela exposição a CC pode provocar rupturas ou interrupção do padrão oscilatório em diferentes ritmos biológicos, incluindo, pressão sanguínea (BRIAUD; ZHANG; SANNAJUST, 2004), níveis circulantes de hormônios (WIDEMAN; MURPHY, 2009; FISCHMAN et al., 1988), expressão gênica, (SUDO et al., 2003), oscilação na concentração de Ca^{2+} em neurônios do NSQs (COLWELL, 2020) e atividade locomotora (BRIAUD; ZHANG; SANNAJUST, 2004; BÜTTNER; WOLLNIK, 1984; CHIESA et al., 2010; HUGHES et al., 2015). A luz é o principal fator ambiental capaz de sincronizar os ritmos endógenos, esta função deve-se provavelmente à sua capacidade de redefinir o sistema circadiano, mesmo em exposições rápidas (KALADCHIBACHI; FERNANDEZ, 2018). A maquinaria do oscilador central sofre um *reset* diário sincronizado pela luz, acredita-se que as proteínas do oscilador central que exercem o papel de sincronizar as alças de autorregulação às informações ambientais sejam PER1 e PER2, isto porque os níveis de seus RNAm aumentam rapidamente após um pulso de luz, enquanto os outros componentes não são imediatamente alterados (FIELD et al., 2000).

Em condições de CC, pode ocorrer três importantes desalinhamentos (dessincronização) entre o relógio central e os osciladores periféricos, conforme demonstrado na figura 14. A primeira possibilidade é a ocorrência de arritmidade, em que cada célula dos NSQs expressa seu próprio padrão rítmico, com diferentes períodos e fases, o que resulta em uma saída arritmica (*output*) (figura 14 A), conforme foi observado na ALE dos animais mantidos por 7 semanas em CC. A segunda possibilidade é a exibição de um ritmo "divididos", com dois componentes independentes, apresentando diferentes períodos circadianos. Esses componentes representam a atividade de cada NSQ que tende a está em fases opostas entre si (Figura 14 B), sugerindo que este evento pode estar acontecendo com os animais do

grupo duas semanas em CC. E ainda pode ocorrer, uma dissociação espontânea em dois componentes do ritmo, um período ambiental e outro relacionado ao relógio endógeno. Isso reflete a atividade das áreas dorsomedial ou ventrolateral do NSQs (Figura 14 C) (revisor por CHIESA et al., 2015).

Figura 14 - Modelos comportamentais de dessincronização: efeitos no SCN.



(a) Claro constante (CC) arritmidade comportamental induzida no camundongo. Células NSQs individuais (representadas em cores diferentes no desenho do painel central e na representação de sua atividade no painel inferior) expressam seu próprio padrão rítmico, com diferentes períodos e fases, o que resulta em uma saída arrítmica como a atividade locomotora. (b) Em esquemas CC crônicos, hamster pode exibir ritmos de atividade locomotora "divididos", com dois componentes independentes de diferentes períodos circadianos. Esses componentes representam a atividade de cada NSQ que tende a ser ativo em fase oposta entre si (painéis do meio e inferior). (c) Ratos sob um ciclo $T = 22$ pode desenvolver uma dissociação espontânea em dois componentes da atividade locomotora, um seguindo o ciclo T e outro relacionado ao relógio endógeno. Isso reflete a atividade das áreas dorsomedial (representada em verde) ou ventrolateral (azul) do NSQ (meio e painéis inferiores).
Fonte: Revisado por CHIESA et al., 2015.

Interessantemente, o presente estudo demonstrou que a exposição CC por duas semanas atenua a atividade convulsiva aguda, durante o SE induzida por Li-PILO. Enquanto, que a exposição ao CC por 7 semanas agrava o SE. Embora, existem

poucos estudos investigando o papel da entrada de luz na ocorrência das crises, algumas evidências sugerem que a hora do dia afeta a susceptibilidade as crises induzidas em modelos experimentais (ROBERTS; KEITH, 1994; STEWART; LEUNG, 2005; STEWART; LEUNG; PERSINGER, 2001; WEISS et al., 1993; YEHUDA; MOSTOFSKY, 1993), como por exemplo, na indução do SE por PILO, durante a fase escura do dia ocorreu menor tempo de latência para a primeira crise e maior gravidade do SE (STEWART; LEUNG, 2005; STEWART; LEUNG; PERSINGER, 2001).

Embora, a causalidade do efeito do CC sobre as crises durante o SE não pôde ser determinadas neste estudo, o mecanismo envolvido nessa relação pode ser provavelmente a oscilação temporal de moléculas envolvidas em vias inibitório e excitatória que também podem ter sofrido alterações, devido a condição de livre curso no momento em que a indução foi realizada. De fato, em condições de CC como melatonina e o cortisol, importantes hormônios envolvidos na saída (*output*) da informação do ritmo, exibem alteração em seus padrões temporais. A melatonina é suprimida durante a fase escura (noite subjetiva) e a variabilidade diária do cortisol é perdida (RUMANOVA; OKULIAROVA; ZEMAN, 2002). As condições de livre curso em CC podem ter alterado os níveis temporais destes hormônios, assim como de outras moléculas no momento da indução do SE, de tal forma que podem ter contribuído para a proteção dos animais CC – 2s e agravado o SE nos animais CC – 7s. Portanto, a realização de estudos com objetivo de caracterizar a oscilação temporal de moléculas envolvidas em vias pro-convulsivante ou anti-convulsivantes poderá contribuir para o entendimento do efeito da luz constante na fase aguda do processo epileptogênico.

4.2 Evolução temporal das CREs em condições CE

Nossos resultados indicam progressão das CREs ao longo do tempo, em animais mantidos no ciclo claro-escuro (Figura 10 A). Este resultado confirma a presença de aumento dependente do tempo na frequência das crises, consistente com outros estudos experimentais e em humanos (FRENCH et al., 1993; HELLIER et al., 1998; JARRETT et al., 2008; SPENCER; SPENCER, 1994; WILLIAMS et al., 2009)

4.3 Oscilação temporal das CREs

Embora a ocorrência das CREs seja um evento adquirido, elas parecem ser influenciadas por um sistema de controle circadiano, conforme demonstrado por Quigg e col (2000) em que a periodicidade circadiana das CREs persistem em uma condição de escuro constante, sugerindo uma dependência do oscilador central (NSQs). Nossos dados, demonstram que os grupos de animais mantidos em ciclo CE apresentam oscilação temporal das CREs em 24h, com alta frequências das CREs na fase clara do dia. Enquanto, o ritmo das CREs é abolido em condições de livre curso em CC. Estes dados somados as evidências científicas sugerem interação entre a ELT com o sistema circadiano, devido ao padrão oscilatório das crises epiléticas, (ARIDA et al., 1999; BERTRAM; CORNETT, 1994; CAVALHEIRO et al., 1991; MATZEN; BUCHHEIM; HOLTKAMP, 2012; MIRZOEV et al., 2012; QUIGG et al., 2000; TCHEKALAROVA et al., 2010, 2011; VAN NIEUWENHUYSE et al., 2015) sendo potencialmente prejudicado quando ocorre a exposição CC.

À medida que o padrão temporal das CREs progride provável ocorre aumento da atividade elétrica no hipocampo, modificando o padrão de oscilação dos genes do relógio, desacoplando os osciladores centrais e periféricos. O hipocampo representa o foco epileptogênico na ELT, sendo também uma região que apresenta atividades oscilatórias ao longo de 24h (BOUCHARD-CANNON et al., 2013; CHAUDHURY; WANG; COLWELL, 2005; IKENO; WEIL; NELSON, 2013; RAWASHDEH et al., 2014). De fato, além da formação da memória e do processo de aprendizagem que são funções inerente ao hipocampo (RUBY et al., 2008; TAKAHASHI, SAWA e OKADA, 2013; RAWASHDEH et al., 2014), atividades biológicas como neurogênese (TAMAI; SANADA; FUKADA, 2008), controle na densidade dendríticas (IKENO; WEIL; NELSON, 2013), assim como potenciação de longa duração (CHAUDHURY; WANG; COLWELL, 2005; O'CALLAGHAN et al., 2012) apresentam oscilação ao longo do dia no hipocampo. Pressupondo assim, que o hipocampo apresenta um papel fundamental na ritmicidade de eventos biológicos importantes na fisiopatologia da epilepsia, sendo considerado a região de interação entre as crises e o ritmo circadiano (CHAUDHURY; WANG; COLWELL, 2005).

4.4 Efeito do tratamento CC sobre as CREs e na ALE

O tratamento de CC por duas ou 7 semanas realizado em animais epiléticos não alterou a gravidade das CREs nas comparações antes e depois do tratamento (Figura 10 B-C), diferentemente do que foi observado nas crises agudas em que houve menor gravidade no SE em animais tratados por duas CC. No entanto, os animais expostos a CC apresentam crises generalizadas tônico-clônicas, o que pode estar relacionada ao envolvimento de outras áreas cerebrais. Durante o SE, aspectos fisiopatológicos são desencadeados a fim de induzir alterações estruturais no cérebro, que incluem perda de neurônios, neurogênese aberrante, gliose, dano axonal, plasticidade dendrítica, expressão gênica alterada, e inflamação, em conjunto denomina-se processo epileptogênico. (CURIA et al., 2014; ENGEL; HENSHALL, 2009; MELDRUM, 1991; PITKÄNEN; LUKASIUK, 2009; VEZZANI et al., 2011). Algumas dessas alterações persistem durante a progressão da ELT, incluindo o desenvolvimento de CREs, perda de células e comorbidades neurológicas (DEVINSKY et al., 2018; RAVIZZA et al., 2017). Acredita-se que esses eventos biológicos sejam modulados por um sistema circadiano (HOOD; AMIR, 2017; IKENO; WEIL; NELSON, 2013, 2014), podendo sofrer alteração quando expostos a condições de livre curso como no CC.

Nosso estudo indica que as crises epiléticas espontâneas, *per se*, alteram o ritmo da ALE (Figura 12) e que esta alteração é agravada em condição de claro constante, possivelmente devido a um efeito combinado da atividade epilética e da luz sobre o sistema de controle do ritmo. De fato, as evidências científicas sugerem que as CREs e CC de forma isolada interferem na oscilação temporal de diversos eventos biológicos, as CREs podem influenciar a atividade-repouso (MATOS et al., 2018; STEWART; LEUNG, 2003), temperatura corporal (QUIGG et al., 1999), níveis circulantes de hormônios (VAN CAMPEN et al., 2015; YALÝN et al., 2006). Assim como, a CC pode interferir na ritmicidade da pressão sanguínea (BRIAUD; ZHANG; SANNAJUST, 2004), níveis circulantes de hormônios (WIDEMAN; MURPHY, 2009; FISCHMAN et al., 1988), expressão gênica, (SUDO et al., 2003), oscilação na concentração de Ca^{2+} em neurônios do NSQs (COLWELL, 2020) e atividade locomotora (BRIAUD; ZHANG; SANNAJUST, 2004; BÜTTNER; WOLLNIK, 1984; CHIESA et al., 2010; HUGHES et al., 2015). Além do mais, foi observado que alguns animais mantidos em CC mantiveram o ritmo circadiano para ALE enquanto outros

perderam a oscilação temporal (arrítmicos), este achado também foi encontrado em outros estudos em livre-curso em CC (Hughes et al., 2015), sugerindo uma variabilidade individual, que torna esses animais mais resistentes a perda do ritmo, apesar do ritmo apresentar-se menos robustos que os animais em CE.

Este estudo sugere a interação entre ritmo circadiano e o processo epileptogênico. Foi demonstrado que o condicionamento dos animais em claro constante por duas semanas altera o ritmo de ALE. No entanto, provoca aumento do tempo de latência para o início do SE e diminuição da severidade das crises agudas. Por outro lado, a exposição ao CC por um longo prazo (7semanas) abole o ritmo de ALE e das CREs, além de agravar as crises agudas durante o SE. O conjunto dos dados sugere que mecanismos de controle do ritmo estão associados à ritmicidade das CREs límbicas e a susceptibilidade das crises durante o SE. Além do mais, o estudo indica que as crises epilépticas espontâneas, *per sí*, alteram o ritmo da ALE e que essa alteração é agravada em condição de claro constante, possivelmente devido a um efeito combinado da atividade epiléptica e da luz sobre o sistema de controle do ritmo. No entanto, mais estudos que investiguem a interação do ritmo circadiano e a epilepsia são necessários para ajudar na compreensão do controle das crises epilépticas por um sistema circadiano, promover o conhecimento da própria fisiopatologia da epilepsia, além de contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

ANDRADE-VALENÇA, L. P. A. et al. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose Hipocampal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 1, p. 31–36, 2006.

ARAUJO, J. F.; MARQUES, N. **Cronobiologia : uma multidisciplinaridade necessária** Margem. [s.l: s.n.].

ARIDA, R. M. et al. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 34, n. 2–3, p. 99–107, 1999.

BAXENDALE, S.; O’SULLIVAN, J.; HEANEY, D. Bright light therapy as an add on treatment for medically intractable epilepsy. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 24, n. 3, p. 359–364, jul. 2012.

BEDROSIAN, T. A.; NELSON, R. J. Timing of light exposure affects mood and brain circuits. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 1, p. e1017–e1017, 31 jan. 2017.

BERTRAM, E. H.; CORNETT, J. F. The evolution of a rat model of chronic spontaneous limbic seizures. **Brain Research**, v. 661, n. 1–2, p. 157–162, 1994.

BOUCHARD-CANNON, P. et al. The Circadian Molecular Clock Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis by Controlling the Timing of Cell-Cycle Entry and Exit. **Cell Reports**, v. 5, n. 4, p. 961–973, 2013.

BENSTAALI, C; MAILLOUX, A; BOGDAN, A; AUZÉBY; TOUITOU, Y. Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents Their relationships with the light-dark cycle. **Life Sciences**. 68, 2645–2656, 2001.

BOROWICZ, K.K. et al. Influence of melatonin upon the protective action of conventional anti-epileptic drugs against maximal electroshock in mice. **European Neuropsychopharmacology** 9;185–190, 1999.

CAVALHEIRO, E. A. et al. Long-Term Effects of Pilocarpine in Rats: Structural Damage of the Brain Triggers Kindling and Spontaneous I Recurrent Seizures. **Epilepsia**, v. 32, n. 6, p. 778–782, 1991.

CHAUDHURY, D.; WANG, L. M.; COLWELL, C. S. Circadian regulation of

hippocampal long-term potentiation. **Journal of Biological Rhythms**, v. 20, n. 3, p. 225–236, jun. 2005.

CHO, C. H. Molecular mechanism of circadian rhythmicity of seizures in temporal lobe epilepsy. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 6, n. NOV, 5 nov. 2012.

COOMANS, C. P.; RAMKISOENSING, A.; MEIJER, J. H. The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 37, n. November, p. 29–42, 2015.

COSTA-LOTUFO, L.V et al. Attenuating effects of melatonin on pilocarpine-induced seizures in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** .131, 521–529, 2002.

DEVINSKY, O. et al. **Epilepsy Nature Reviews Disease Primers** Nature Publishing Group, , 3 maio 2018.

DEPRÈS-BRUMMER P, LÉVI F, METZGER G, TOUITOU Y. **Light-induced suppression of the rat circadian system**. American Journal of Physiology 1995; 268 R1111–R1116

DUFFIELD, G. E. **DNA microarray analyses of circadian timing: The genomic basis of biological time** **Journal of Neuroendocrinology**, 1 out. 2003.

DUNLAP, J. C. Closely watched clocks: molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora* and *Drosophila*. **Trends in Genetics**, v. 6, n. C, p. 159–165, 1 jan. 1990.

DURAZZO, T. S. et al. Temporal distributions of seizure occurrence from various epileptogenic regions. **Neurology**, v. 70, n. 15, p. 1265–71, 8 abr. 2008.

ENGEL, J. Mesial Temporal Lobe Epilepsy: What Have We Learned? **The Neuroscientist**, v. 7, n. 4, p. 340–352, 2001.

ELKHAYAT, H.A et al. Melatonin and Sleep-Related Problems in Children With Intractable Epilepsy. *Pediatric neurology*. 42; 4; 249-253, 2010.

FIELD, M. D. et al. Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates

phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms.

Neuron, v. 25, n. 2, p. 437–447, 1 fev. 2000.

FISHER, R. S. et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy.

Epilepsia, v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014.

FILIPSKI E, KING VM, LI X et al. Disruption of circadian coordination accelerates malignant growth in mice. *Pathol Biol* 51:216–219, 2003

FLÔRES, D. E. F. L. Investigando a sincronização fótica na natureza. **Revista da Biologia**, v. 9, n. 3, p. 7–12, 2012.

FRENCH, J. A. et al. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. **Annals of Neurology**, v. 34, n. 6, p. 774–780, dez. 1993.

GITAÍ, D. L. G. et al. The non-coding RNA BC1 is down-regulated in the hippocampus of Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain after audiogenic kindling. **Brain Research**, v. 1367, p. 114–121, 2011.

GOOLEY JJ, CHAMBERLAIN K, SMITH KA et al. Exposure to room light before bedtime suppresses melatonin onset and shortens melatonin duration in humans. *J Clin Endocrinol Met* 96:463–472, 2011.

GOLDBERG-STERN, H; Oren,, H; Peled, N; Garty , B.Z. Effect of Melatonin on Seizure Frequency in Intractable Epilepsy: A Pilot Study. *J. Child Neurol* 2012 27: 1524, 2012

HASTINGS, M. H.; MAYWOOD, E. S.; BRANCACCIO, M. **Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus** *Nature Reviews Neuroscience* Nature Publishing Group, , 1 ago. 2018.

HOFSTRA-VAN OOSTVEEN, W. A.; DE WEERD, A. W. Seizures, epilepsy, and circadian rhythms. **Sleep Medicine Clinics**, v. 7, n. 1, p. 99–104, 2012.

IKENO, T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Photoperiod affects the diurnal rhythm of hippocampal neuronal morphology of siberian hamsters. **Chronobiology International**, v. 30, n. 9, p. 1089–1100, 2013.

JANSEN, M. J. et al. **CRONOBIOLOGIA E SEUS MECANISMOS HISTÓRICO E BASES INICIAIS**. Rio de Janeiro: [s.n.].

KALADCHIBACHI, S.; FERNANDEZ, F. Precision Light for the Treatment of Psychiatric Disorders. **Neural Plasticity**, v. 2018, 2018.

KALEYIAS, J. et al. Sleep-wake patterns of seizures in children with lesional epilepsy. **Pediatric Neurology**, v. 45, n. 2, p. 109–113, 2011.

KO, C. H.; TAKAHASHI, J. S. Molecular components of the mammalian circadian clock. **Human Molecular Genetics**, v. 15, p. 271–277, 2006.

KOJIMA, S.; GREEN, C. B. Circadian genomics reveal a role for post-transcriptional regulation in mammals. **Biochemistry**, v. 54, n. 2, p. 124–133, 20 jan. 2015.

KOSSOFF, E. H. et al. Optimal clinical management of children receiving the ketogenic diet: Recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group. **Epilepsia**, v. 50, n. 2, p. 304–317, 27 jan. 2009.

LEGATES, T. A.; FERNANDEZ, D. C.; HATTAR, S. **Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect** *Nature Reviews Neuroscience* Nature Publishing Group, , 2014.

LI, J.-D.; HU, W.-P.; ZHOU, Q.-Y. **The circadian output signals from the suprachiasmatic nuclei**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2012. v. 199

LIMA, E; CABRAL, F.R; CAVALHEIRO, E A et al. Melatonin administration after pilocarpine-induced status epilepticus: A new way to prevent or attenuate postlesion epilepsy? **Epilepsy & Behavior** 20 , 607–612, 2011.

LIU, A. C. et al. Intercellular Coupling Confers Robustness against Mutations in the SCN Circadian Clock Network. **Cell**, v. 129, n. 3, p. 605–616, 4 maio 2007.

LOGAN, R. W.; MCCLUNG, C. A. Rhythms of life: circadian disruption and brain

disorders across the lifespan HHS Public Access. **Nat Rev Neurosci.**, v. 20, n. 1, p. 49–65, 2019.

M K CHANDRASHEKARAN. **Biological rhythms research: A personal account.** Índia: [s.n.].

MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: Princípios e Aplicações.** 3^a ed. São Paulo: Coleção Acadêmica, 2005.

MARQUES, T. E. B. S. **Efeito da alteração do fotoperíodo na epileptogênese.** [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2018.

MATEEN, F. J. et al. Light therapy for multiple sclerosis-associated fatigue Study protocol for a randomized controlled trial Study Protocol Clinical Trial. 2017.

MATHERN, G. W. et al. EHLEPSY RESEARCH The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. v. 26, 1996.

MATOS, H. DE C. et al. Rhythms of core clock genes and spontaneous locomotor activity in post-status Epilepticus model of mesial temporal lobe epilepsy. **Frontiers in Neurology**, v. 9, n. AUG, 2 ago. 2018.

MATZEN, J.; BUCHHEIM, K.; HOLTKAMP, M. Circadian dentate gyrus excitability in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Experimental Neurology**, v. 234, n. 1, p. 105–111, 2012.

MAZZOCOLI, G.; PAZIENZA, V.; VINCIGUERRA, M. Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. **Chronobiology international**, v. 29, n. 3, p. 227–51, abr. 2012.

MINORS, D. S.; WATERHOUSE, J. M. Endogenous and exogenous components of circadian rhythms when living on a 21-hour day. **International Journal of Chronobiology**, v. 8, n. 1, p. 31–48, 1981.

MIRZOEV, A. et al. Circadian profiles of focal epileptic seizures: A need for reappraisal. **Seizure: European Journal of Epilepsy**, v. 21, p. 412–416, 2012.

MOLINA-CARBALLO A, ACUFIA-CASTROVIEJO D, RODRIGUEZ-CABEZAS T, MUFIOZ-HOYOS A. Effects of febrile and epileptic convulsions on daily variations in plasma melatonin concentration in children. **J. Pineal Res.** 1, **6**: 1-9, 1994.

NONINO-BORGES, C. B. et al. The ketogenic diet on the treatment of drug resistant epilepsies. **Revista de Nutricao**, v. 17, n. 4, 2004.

NZWALO, H. et al. 24-hour rhythmicity of seizures in refractory focal epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 55, p. 75–78, 2016.

O'CALLAGHAN, E. K. et al. Long-Lasting Effects of Sepsis on Circadian Rhythms in the Mouse. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

OLBRICH, A. et al. Semiology of temporal lobe epilepsy in children and adolescents value in lateralizing the seizure onset zone. **Epilepsy Research**, v. 48, n. 1–2, p. 103–110, 1 jan. 2002.

OPAS/OMS Brasil - OMS destaca escassez de tratamento para epilepsia em países de baixa renda. Disponível em:

<https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5972:oms-destaca-escassez-de-tratamento-para-epilepsia-em-paises-de-baixa-renda&Itemid=839>. Acesso em: 29 abr. 2020.

PARTCH, C. L.; GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S. **Molecular architecture of the mammalian circadian clock** *Trends in Cell Biology* Elsevier, , 1 fev. 2014.

PITSCH, J. et al. Circadian clustering of spontaneous epileptic seizures emerges after pilocarpine-induced status epilepticus. **Epilepsia**, v. 58, n. 7, p. 1159–1171, jul. 2017.

QUIGG, M. et al. Hypothalamic neuronal loss and altered circadian rhythm of temperature in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 40, n. 12, p. 1688–1696, 1999.

QUIGG, M. et al. Effects of circadian regulation and rest-activity state on spontaneous seizures in a rat model of limbic epilepsy. **Epilepsia**, v. 41, n. 5, p. 502–

9, 2000.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 32, n. 3, p. 281–294, 1 mar. 1972.

RAWASHDEH, O. et al. PERIOD1 coordinates hippocampal rhythms and memory processing with daytime. **Hippocampus**, v. 24, n. 6, p. 712–723, 1 jun. 2014.

REINBERG AE, SMOLENSKY MH. Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine. In: Touitou Y, Haus E, editors. Biologic rhythms in clinical and laboratory medicine. New York: Springer Verlag. 1992. pp. 243–255.

REFINETTI, R. Biological Rhythms. In: **Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set**. [s.l.] Elsevier Inc., 2008. p. 420–426.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 935–941, ago. 2002.

RUMANOVA, V.S; OKULIAROVA, M; ZEMAN, M Differential Effects of Constant Light and Dim Light at Night on the Circadian Control of Metabolism and Behavior. **Int. J. Mol. Sci**, 21, 5478, 2020.

ROBERTS, A. J.; KEITH, L. D. Sensitivity of the circadian rhythm of kainic acid-induced convulsion susceptibility to manipulations of corticosterone levels and mineralocorticoid receptor binding. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 9, p. 1087–1093, 1994.

SCHEFFER, I. E. et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 512–521, 1 abr. 2017.

SCHWARTZ, W. J.; DAVIDSEN, L. C.; SMITH, C. B. In vivo metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 189, n. 1, p. 157–167, 1 jan. 1980.

SCHWARTZ, W. J.; GAINER, H. Suprachiasmatic nucleus: Use of ¹⁴C-Labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. **Science**, v. 197, n. 4308, p. 1089–

1091, 9 set. 1977.

SEKIGUCHI, H.; IRITANI, S.; FUJITA, K. Bright light therapy for sleep disturbance in dementia is most effective for mild to moderate Alzheimer's type dementia: a case series. **Psychogeriatrics**, v. 17, n. 5, p. 275–281, 1 set. 2017.

SHARMA, A. K. et al. Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Pathogenesis, Induced Rodent Models and Lesions. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 984–999, 2007.

STEWART, L. .; LEUNG, L. . Temporal lobe seizures alter the amplitude and timing of rat behavioral rhythms. **Epilepsy & Behavior**, v. 4, n. 2, p. 153–160, abr. 2003.

STEWART, L. S.; LEUNG, L. S. Hippocampal Melatonin Receptors Modulate Seizure Threshold. **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 473–480, abr. 2005.

STEWART, L. S.; LEUNG, L. S.; PERSINGER, M. A. Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonic-clonic seizure activity. **Epilepsy Research**, v. 44, n. 2–3, p. 207–212, 2001a.

STEWART, L. S.; LEUNG, L. S.; PERSINGER, M. A. Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonic-clonic seizure activity. **Epilepsy Research**, v. 44, n. 2–3, p. 207–212, 1 maio 2001b.

STRATMANN, M.; SCHIBLER, U. Properties, Entrainment, and Physiological Functions of Mammalian Peripheral Oscillators. **Journal of Biological Rhythms**, v. 21, n. 6, p. 494–506, 29 dez. 2006.

TAKAHASHI, J. S. et al. **The genetics of mammalian circadian order and disorder: Implications for physiology and disease** *Nature Reviews Genetics*. NIH Public Access, , out. 2008.

TAKAHASHI, J. S. **Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock** *Nature Reviews Genetics* Nature Publishing Group, , 1 mar. 2017.

TAMAI, S. I.; SANADA, K.; FUKADA, Y. Time-of-day-dependent enhancement of adult neurogenesis in the hippocampus. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, 2008.

TCHEKALAROVA, J. et al. Diurnal rhythms of spontaneous recurrent seizures and

behavioral alterations of Wistar and spontaneously hypertensive rats in the kainate model of epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 17, n. 1, p. 23–32, 2010.

TCHEKALAROVA, J. et al. Diurnal variations in depression-like behavior of Wistar and spontaneously hypertensive rats in the kainate model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 20, n. 2, p. 277–285, 2011.

UPADHYA, D. et al. A model of chronic temporal lobe epilepsy presenting constantly rhythmic and robust spontaneous seizures, co-morbidities and hippocampal neuropathology. **Aging and Disease**, v. 10, n. 5, p. 915–936, 2019.

VAN CAMPEN, J. S. et al. Seizure occurrence and the circadian rhythm of cortisol: A systematic review. **Epilepsy and Behavior**, v. 47, p. 132–137, 22 jul. 2015.

VAN NIEUWENHUYSE, B. et al. The systemic kainic acid rat model of temporal lobe epilepsy: Long-term EEG monitoring. **Brain Research**, v. 1627, p. 1–11, 2015.

VIDENOVIC, A. et al. “The clocks that time us” - Circadian rhythms in neurodegenerative disorders **Nature Reviews Neurology** Nature Publishing Group, , 11 dez. 2014.

VIDENOVIC, A. et al. Timed light therapy for sleep and daytime sleepiness associated with Parkinson disease a randomized clinical trial. **JAMA Neurology**, v. 74, n. 4, p. 411–418, 1 abr. 2017.

WEISS, G. et al. The effect of adrenalectomy on the circadian variation in the rate of kindled seizure development. **Brain Research**, v. 612, n. 1–2, p. 354–356, 28 maio 1993.

WILLIS, G. L.; MOORE, C.; ARMSTRONG, S. M. A historical justification for and retrospective analysis of the systematic application of light therapy in Parkinson's disease. **Reviews in the Neurosciences**, v. 23, n. 2, p. 199–226, 2012.

YALÝN, Ö. et al. A comparison of the circadian rhythms and the levels of melatonin in patients with diurnal and nocturnal complex partial seizures. **Epilepsy and Behavior**, v. 8, n. 3, p. 542–546, maio 2006.

YEHUDA, S.; MOSTOFISKY, D. I. Circadian Effects of fl-Endorphin , Melatonin ,

DSIP , and Amphetamine on Pentylentetrazol- Induced Seizures. **Peptides**, v. 14, n. 1, p. 203–205, 1993.

ZHANG, R. et al. A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 45, p. 16219–16224, 11 nov. 2014.

ZEITZER JM, DIJK DJ, KRONAUER R et al. Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression. *J Physiol* 526:695–702, 2000

7.1 Protocolos do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (nº 62-2014 e 17-2017)


UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO
PROJETO Nº 62/2014

TÍTULO: Avaliação de alterações epigenéticas e disfunção mitocondrial em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal mesial.

RESPONSÁVEL: Daniel Leite Góes Gitai

OBJETIVO: Analisar alterações epigenéticas e disfunção mitocondrial em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal mesial.

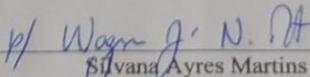
SITUAÇÃO: Aprovado

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 22.06.2015 a 22.06.2018

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Rato heterogênico	Wistar	108

Maceió, 16 de junho de 2015.



Silvana Ayres Martins
Coordenadora da CEUA/UFAL

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120868



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

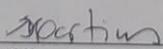


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Influência do fotoperíodo sobre o modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por lítio-pilocarpina em ratos”**, registrada com o nº 17/2017, sob a responsabilidade do pesquisador **Prof. Daniel Leite Góes Gitaí**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **para fins de pesquisa científica**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 14.07.2017.

Vigência da autorização	21.07.2017 a 21.07.2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	220
Peso/idade	150-250g / 45 dias
Sexo	220 machos
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Ufal / Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular Molecular – ICBS/UFAL

Maceió, 18 de julho de 2017.


Prof. Dr. Silvana Ayres Martins
Coordenadora CEUA/UFAL

Prof. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120858

7.2 Artigo em colaboração



Rhythms of Core Clock Genes and Spontaneous Locomotor Activity in Post-Status Epilepticus Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy

Heloise de Carvalho Matos¹, Bruna Del Vecchio Koike², Wanessa dos Santos Pereira³, Tiago G. de Andrade^{3,2}, Olagide W. Castro⁴, Marcelo Duzzioni⁴, Maheshwar Kodali⁵, Joao P. Leite⁶, Ashok K. Shetty^{7*} and Daniel L. G. Gital^{1,2*}

¹ Department of Cellular and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil, ² Laboratory of Molecular Chronobiology, Federal University of Alagoas, Arapiraca, Brazil, ³ Department of Physiology and Pharmacology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil, ⁴ Institute for Regenerative Medicine, Department of Molecular and Cellular Medicine, Texas A&M Health Science Center College of Medicine, College Station, TX, United States, ⁵ Division of Neurology, Department of Neuroscience and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ⁶ Faculty of Medicine, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Patrick A. Rowell,
Georgetown University, United States

Reviewed by:

Jana Dimitrova Tchevalarova,
Institute of Neurobiology (IAC),
Bulgaria
Thomas Nicholas Fenners,
Cooper Medical School of Rowan
University, United States

*Correspondence:

Ashok K. Shetty
shetty@medicine.tamhsc.edu
Daniel L. G. Gital
danielgital@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Epilepsy,
a section of the journal
Frontiers in Neurology

Received: 18 December 2017

Accepted: 12 July 2018

Published: 02 August 2018

Citation:

Matos HC, Koike BDV, Pereira WS,
de Andrade TG, Castro OW,
Duzzioni M, Kodali M, Leite JP,
Shetty AK and Gital DLG (2018)
Rhythms of Core Clock Genes and
Spontaneous Locomotor Activity in
Post-Status Epilepticus Model of
Mesial Temporal Lobe Epilepsy.
Front. Neurol. 8:632.
doi: 10.3389/fneur.2018.00632

The interaction of Mesial Temporal Lobe Epilepsy (mTLE) with the circadian system control is apparent from an oscillatory pattern of limbic seizures, daytime's effect on seizure onset and the efficacy of antiepileptic drugs. Moreover, seizures *per se* can interfere with the biological rhythm output, including circadian oscillation of body temperature, locomotor activity, EEG pattern as well as the transcriptome. However, the molecular mechanisms underlying this cross-talk remain unclear. In this study, we systematically evaluated the temporal expression of seven core circadian transcripts (*Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, *Per2*, and *Per3*) and the spontaneous locomotor activity (SLA) in post-status epilepticus (SE) model of mTLE. Twenty-four hour oscillating SLA remained intact in post-SE groups although the circadian phase and the amount and intensity of activity were changed in early post-SE and epileptic phases. The acrophase of the SLA rhythm was delayed during epileptogenesis, a fragmented 24 h rhythmicity and extended active phase length appeared in the epileptic phase. The temporal expression of circadian transcripts *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, *Per2*, and *Per3* was also substantially altered. The oscillatory expression of *Bmal1* was maintained in rats imperiled to SE, but with lower amplitude ($A = 0.2$) and an advanced acrophase in the epileptic phase. The diurnal rhythm of *Cry1* and *Cry2* was absent in the early post-SE but was recovered in the epileptic phase. *Per1* and *Per2* rhythmic expression were disrupted in post-SE groups while *Per3* presented an arrhythmic profile in the epileptic phase, only. The expression of *Clock* did not display rhythmic pattern in any condition. These oscillating patterns of core clock genes may contribute to hippocampal 24 h cycling and, consequently to seizure periodicity. Furthermore, by using a pool of samples collected at 6 different Zeitgeber Times (ZT), we found that all clock transcripts were significantly dysregulated after SE