

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

GABRIELE FERNANDA DA CONCEIÇÃO SANTOS

Perfil das Crises Epiléticas e Ritmo Circadiano de Animais Submetidos ao Claro Constante
em Modelo Experimental de Epilepsia Lobo Temporal

Maceió
2019

GABRIELE FERNANDA DA CONCEIÇÃO SANTOS

Perfil das Crises Epiléticas e Ritmo Circadiano de Animais Submetidos ao Claro Constante em Modelo Experimental de Epilepsia do Lobo Temporal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitai

Maceió
2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S237p

Santos, Gabriele Fernanda da Conceição.

Perfil das crises epiléticas e ritmo circadiano de animais submetidos ao claro constante em modelo experimental de epilepsia lobo temporal / Gabriele Fernanda da Conceição Santos. – 2019.

45 f.: il. color.

Orientador: Daniel Leite Góes Gitai.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 36-45.

1. Epilepsia do lobo temporal. 2. Ritmo circadiano. 3. Ritmos biológicos. 4. Modelos animais. I. Título.

CDU: 616.853

FOLHA DE APROVAÇÃO



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A, C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppacs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Gabriele Fernanda da Conceição Santos

Perfil das crises epilépticas e ritmo circadiano de animais submetidos ao claro constante em modelo experimental de epilepsia lobo temporal

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 20 de Fevereiro de 2019.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Daniel Leite Goes Gitai (Orientador)

Prof. Dr. Daniel Gomes Coimbra - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Mykaella Andrade de Araújo - (Faculdade Pitágoras)

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu salvador, por me dar força, saúde, paciência para enfrentar as batalhas diárias e por sempre está presente em minha vida, pois sem ele eu não seria nada.

Aos meus pais, Maria Bernadete e Amaro José, minhas outras bençãos, pelo amor, paciência, incentivo, preocupação e por sempre estarem presentes em minha vida.

Ao Prof. Dr. Daniel Gitaí pela orientação, pelo apoio e incentivo à ciência

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular em especial: Myka, Carmem, Wanessa, pela grande ajuda, palavras.

Aos meus amigos pela amizade, compreensão, trocas de experiências, conselhos e por todos os momentos de convivência, em especial: Pedro, Junior, Geraldo, Alessandro, Marcus.

As instituições CAPES, CNPQ e FAPESP pelo apoio financeiro.

E a todos que indiretamente ou diretamente fizeram parte da minha formação.

RESUMO

A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) é uma condição crônica caracterizada pela ocorrência de crises espontâneas e recorrentes (CREs) decorrentes de atividade neuronal excessiva em regiões límbicas do cérebro. Na maioria dos casos, o estabelecimento da epilepsia está associado a mudanças estruturais e fisiológicas que ocorrem progressivamente no cérebro a partir de um insulto epileptogênico, tal como o *Status epilepticus* (SE). O período de conversão de um cérebro normal em um epilético – denominado de epileptogênese – é variável (meses há anos) e envolve um amplo espectro de processos biológicos, incluindo neurodegeneração, neurogênese, inflamação, plasticidade sináptica, migração celular dentre outros. Curiosamente, ao final deste período, o indivíduo apresenta crises que, embora imprevisíveis, cursam com um padrão temporal de oscilação (circadiano e ultradiano). O ritmo de recorrência é mantido mesmo em condição de livre curso no escuro, o que tem despertado o interesse do envolvimento do sistema endógeno do relógio na modulação do limiar de susceptibilidade a crises. Recentemente, observamos que os genes do relógio têm sua expressão modulada pelo processo epileptogênico induzido em modelo experimental, fornecendo evidências moleculares sobre o efeito da epileptogênese na ritmicidade circadiana. Neste estudo, investigamos a hipótese de que alterações no ritmo circadiano interferem no processo epileptogênico e no perfil das crises espontâneas. O modelo experimental utilizado foi o de indução de SE por meio da injeção de lítio-pilocarpina. Ratos *Wistar* foram expostos ao claro-constante (grupo experimental) ou claro-escuro (grupo controle) durante todo o período de experimentação. Os animais foram vídeo-monitorados de forma contínua por um período de 55 dias contados a partir da indução do SE. Avaliamos a frequência e gravidade das crises epiléticas e a ritmicidade da atividade locomotora espontânea (ALE) antes da indução do SE e durante a fase crônica da epileptogênese. A gravidade das crises foi avaliada usando a escala de Racine e a ALE foi analisada pelo software Acrophase e El Temps. A proporção de animais que desenvolveram crises espontâneas foi maior no grupo mantido em regime de claro constante indicando que a interferência no ritmo facilitou a epileptogênese. Os animais submetidos a luz constante tiveram o ritmo da atividade locomotora alterado, embora apenas 46% perderam completamente o ritmo ao fim do período de experimentação. Interessantemente, apenas esse subgrupo apresentou uma maior frequência e gravidade nas crises epiléticas e espontâneas quando comparados com os animais que não perderam o ritmo provenientes dos grupos claro constante ou claro-escuro. Desse modo, nosso estudo sugere que a exposição a luz constante pode facilitar a epileptogênese e que o desacoplamento do ritmo da atividade locomotora pode aumentar a gravidade e frequência das CREs.

ABSTRACT

Mesial temporal lobe epilepsy (ELTM) is a chronic condition characterized by the occurrence of spontaneous and recurrent seizures (SRS) due to excessive neuronal activity in limbic regions of the brain. In most cases, the onset of epilepsy is associated with structural and physiological changes that occur progressively in the brain from an epileptogenic insult, such as Status epilepticus (SE). The period of conversion of a normal brain into an epileptic - called epileptogenesis - is variable (months to years) and involves a broad spectrum of biological processes, including neurodegeneration, neurogenesis, inflammation, synaptic plasticity, cell migration, among others. Interestingly, at the end of this period, the individual presents with crises that, although unpredictable, follow a temporal pattern of oscillation (circadian and ultradian). The rhythm of recurrence is maintained even in free-flowing conditions in the dark, which has aroused interest in the involvement of the endogenous clock system in the modulation of the crisis susceptibility threshold. Recently, we observed that the clock genes present their modulated expression in the epileptogenic process induced in the experimental model, providing molecular evidence on the effect of epileptogenesis on circadian rhythmicity. In this study, we investigated the hypothesis that alterations in the circadian rhythm interfere in the epileptogenic process and in the profile of the spontaneous crises. The experimental model used was the induction of SE by the injection of lithium-pilocarpine. Wistar rats were exposed to the constant light (experimental group) or light-dark cycles (control group) throughout the experiment period. The animals were monitored continuously for a period of 55 days from SE induction. We evaluated the frequency and severity of epileptic seizures and the rhythmicity of spontaneous locomotor activity (SLA) prior to SE induction and during the chronic phase of epileptogenesis. Crisis severity was assessed using the Racine scale and SLA was analyzed by Acrophase and El Temps software. The proportion of animals that developed spontaneous seizures was higher in the group kept in constant clear regime indicating that the interference in the rhythm facilitated epileptogenesis. Animals submitted to constant light had the rhythm of locomotor activity altered, although only 46% completely lost their rhythm at the end of the experiment period (55 days after SE induction). Interestingly, only this subgroup showed a higher frequency and severity in epileptic and spontaneous seizures when compared to animals that did not lose rhythm from the clear or constant light groups. In conclusion, our study suggests that exposure to constant light may facilitate epileptogenesis and that decoupling of the rhythm of locomotor activity may mitigate the severity and frequency of SRS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação Esquemática do Delineamento Experimental grupo <i>naïve</i> C/E.....	23
Figura 2 – Representação Esquemática do Delineamento Experimental grupo epilético C/E.....	23
Figura 3 – Representação Esquemática do Delineamento Experimental grupo <i>naïve</i> C/C.....	24
Figura 4 – Representação Esquemática do Delineamento Experimental grupo epilético C/C.....	24
Figura 5 – Actograma duplicado representativo da análise da atividade locomotora nos grupos experimentais.....	28
Figura 6 – Proporção das CREs nos grupos experimentais	30
Figura 7 – Média total e nível de CREs dos grupos experimentais.....	31
Figura 8 – Gráfico na forma de onda e actograma representativo da análise da atividade locomotora nos grupos experimentais.....	33
Figura 9 – Análise das CREs dos animais epiléticos CC e CC rítmico e arrítmico.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escala comportamental de crises límbicas de Racine (1972)	26
Tabela 2 – Análise da ritmicidade individual do grupo <i>naïve</i> C/C nos últimos cinco dias de ALE.....	29

ABREVIATURAS

ALE	Atividade Locomotora Espontânea
C/C	Claro Constante
C/E	Claro Escuro
CREs	Crises Recorrente e Espontâneas
DA	Doença de Alzheimer
DAEs	Drogas Antiepiléticas
DH	Doença de Huntington
DP	Doença de Parkinson
ELT	Epilepsia Lobo Temporal
ELTN	Epilepsia Lobo Temporal Neocortical
ELTM	Epilepsia Lobo Temporal Mesial
IN	Intraperitoneal
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PILO	Pilocarpina
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
ILAE	International League Against Epilepsy

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Epilepsia	13
2.2 Modelo Experimental	15
2.3 Ritmo Circadiano.....	15
2.5 Ritmo Circadiano e Doenças	17
2.6 Ritmo Circadiano e Epilepsia.....	18
2.7 A interação entre o sistema de controle do ritmo circadiano e a epileptogênese ocorre de forma bidirecional.....	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivo Especifico	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Estabelecimento dos Grupos Experimentais	22
4.1.1 Animais.....	22
4.2 Protocolo usado para estabelecimento do modelo de ELTm	25
4.3 Avaliação das CREs	25
4.4 Avaliação da Atividade Locomotora Espontânea	26
4.5 Análise Estatística	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Análise da exposição ao Claro Constante na Alteração do Ritmo da Atividade Locomotora	28
5.2 Análise da Exposição ao Claro Constante na Epileptogênese e Ritmicidade da Atividade Locomotora.....	29
6 CONCLUSÃO.....	37
7 REFERÊNCIA	38
8 ANEXO.....	48

1 INTRODUÇÃO

Epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado pela predisposição persistente do cérebro em gerar crises epiléticas, que resultam em prejuízos cognitivos, neurológicos, psicológicos e sociais para o indivíduo (FISHER et al., 2014). Aproximadamente cinquenta milhões de pessoas no mundo sofrem de epilepsia com crises ativas necessitando de tratamento. Aproximadamente 30% dos pacientes são refratários ao tratamento medicamentoso (WHO, 2010). Dentre os tipos de epilepsia, a epilepsia do lobo temporal (ELT) é a mais prevalente em adultos (TATUM, 2012). Apesar das crises epiléticas serem imprevisíveis há uma certa ritmicidade circadiana em sua ocorrência (MIRZOEV, et al., 2012).

Os ritmos circadianos são ritmos biológicos, que ocorrem com um período de duração de aproximadamente 24 horas. Eles estão envolvidos no controle dos processos bioquímicos, fisiológicos, moleculares e comportamentais como uma resposta adaptativa às mudanças ambientais. (WANG et al., 2009; GERY; KOEFFLER, 2010; LI; HU; ZHOU, 2012; MATOS et al., 2018). A luz é o principal sincronizador ambiental usado pelo corpo para discriminar dia e noite e assim regular o ritmo circadiano. Uma desregulação no ritmo pode agravar ou levar ao aparecimento de algumas doenças, dentre essas inclui-se a epilepsia.

Pesquisas recentes mostram que as crises epiléticas ocorrem em padrões diurno e circadiano, sugerindo que os mecanismos de regulação dos ritmos biológicos possam ter um papel na epilepsia (VAN NIEUWENHUYSE et al., 2015; NZWALO et al., 2016, GITAI et al, 2019).

Visto que as crises recorrentes e espontâneas (CREs) apresentam um padrão temporal diurno e que a luz é um importante sincronizador do ritmo circadiano, o que aconteceu com as crises ao interferir no ritmo circadiano? Esta questão norteou este estudo. Investigamos o efeito do claro constante na epileptogênese e no perfil das crises epiléticas em modelo experimental de *Status epilepticus* (SE) induzido pela injeção de Litio-Pilo Como marcador de ritmicidade circadiano avaliamos a atividade locomotora espontânea dos animais

A compreensão da relação entre sistema circadiano e epilepsia poderá contribuir para o conhecimento da fisiopatologia da epilepsia, bem como para o desenvolvimento de terapias que sejam eficazes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epilepsia

Na epilepsia, o cérebro apresenta uma predisposição permanente para gerar crises epiléticas com graves consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais (FISHER et al., 2014). Aproximadamente 1 a 2% da população mundial são portadores de epilepsia (STRINE et al., 2005)

As crises epiléticas são manifestações motoras e/ou sensoriais de natureza espontânea e autolimitada (ENGEL, 1995; LOTHMAN et al., 1991) que refletem um desequilíbrio entre os sistemas inibitórios e excitatórios, caracterizado por uma atividade excessiva ou hipsincrônica de neurônios no Sistema Nervoso Central (SNC) (MELDRUM, 1985). Segundo a *International League Against Epilepsy* (ILAE) de 2017, as crises epiléticas são classificadas como focais ou generalizadas conforme localização do foco epileptogênico. Nas crises generalizadas as descargas elétricas se originam nos dois hemisférios cerebrais. Já nas crises focais o início da crise se restringe a uma sub-região específica do encéfalo. As crises focais podem ser classificadas em complexa quando cursam com comprometimento da consciência, ou em simples quando não há o comprometimento da consciência (FERNANDES, 2013).

Por outro lado, a classificação da epilepsia (e não das crises) leva em consideração a investigação clínica do perfil das crises, estudos eletroencefalográficos e de neuroimagem, bem como estudos que exploram a etiologia da doença (FISHER et al., 2017). A origem etiológica é um critério importante e que exerce influência no desenvolvimento da doença, além de servir de base para pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Com bases nestes critérios, a ILAE (2017) classifica a epilepsia em estrutural, genética, imune, infecciosa, metabólica ou de causa desconhecida (SCHEFFER et al., 2017).

As epilepsias de etiologia estrutural são aquelas que são causadas por lesões estruturais podendo ser sub-classificadas em: adquiridas, quando foram deflagradas por um insulto inicial (por um trauma, acidente vascular cerebral, infecção e SE), ou genéticas quando provocadas por mutações de ganho ou perda de função. O exemplo mais comum de epilepsia com etiologia estrutural é a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) que tem sido alvo de estudos do nosso grupo de pesquisa devido sua importância clínica justificada pela gravidade, alta incidência e, principalmente, refratariedade ao tratamento medicamentoso (ILAE 2017).

De fato, a ELT é responsável por aproximadamente 40% a 70% dos casos em adultos (ENGEL, 2001). Cerca de 30% dos pacientes de ELT são resistentes ao tratamento farmacológico, nestes casos, a ressecção cirúrgica é o tratamento indicado, mas que está associado a comprometimento de funções cognitivas (ENGEL, 2001). Outras opções terapêuticas alternativas como a dieta cetogênica (VACCAREZZA; SILVA, 2015), neuroestimulação (LAXER et al., 2014) e mudanças no estilo de vida podem ajudar no controle parcial das crises.

A ELT é caracterizada pela ocorrência de crises que tem origem em estruturas neocorticais ou mesiais, o que dá nome aos subtipos: epilepsia do lobo temporal neocortical (ELTN) e epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) (BERCOVICI et al., 2012). A ELTM é o tipo de epilepsia focal que possui maior importância clínica devido a sua alta incidência e gravidade, representando cerca de 60% dos casos de ELT (ENGEL, 1997; FRENCH, 1993). Pacientes com ELTM apresentam crises focais complexas ou simples, iniciando em estruturas mesiais do lobo temporal, geralmente precedidas por auras (FERNANDES, 2013) e que podem durar de segundos a um período de 1-2 minutos antes que a consciência seja perdida (BLAIR, 2012). As auras são componentes das crises que ocorrem antes da perda da consciência, em que o paciente recorda os sintomas premonitórios no período pós-ictal (TANURI, et al., 2000)

A esclerose hipocampal (EH) ocorre em 50-70% dos pacientes com ELTM refratária ao tratamento farmacológico (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006). A perda celular nos subcampos CA1, CA3 e hilo do hipocampo, gliose e dispersão de células granulares do giro denteado são características associadas a EH (BABB, 1987; FERNANDES, 2013). Além disso, EH faz parte de um conjunto de alterações que ocorrem durante a epileptogênese que pode ser causada a partir de um insulto no SNC, tais como convulsão febril, lesões como trauma, neoplasia, malformação vascular e SE (FRENCH et al., 1993).

O processo epileptogênico em pacientes portadores de ELTM consiste tipicamente em 3 fases: insulto inicial (tais como injúria cerebral decorrente de convulsão febril, traumatismo ou acidente vascular encefálico); um período de latência (epileptogênese) onde não há manifestação comportamental de crise; e período crônico, caracterizado pela ocorrência de CREs (MATHERN et al., 1996).

Embora muitos mecanismos tenham sido reportados, dada a alta refratariedade ao tratamento, conhecer os mecanismos moleculares subjacentes ao processo epileptogênico faz-se necessários. Neste sentido os modelos experimentais são ferramentas importantes.

2.2 Modelo Experimental

Existem diferentes tipos de modelos experimentais para indução da ELT, sendo os mais utilizados aqueles baseados em estimulação elétrica ou química de estruturas límbicas, como hipocampo e amígdala. A estimulação química tem sido realizada através da utilização de drogas como o ácido caínico e pilocarpina (PILO) que induzem convulsões autossustadas ou SE por aumentar a neurotransmissão colinérgica mediante a inibição GABAérgica ou estimulação glutamatérgica (REDDY; KURUBA, 2013).

Em roedores, a PILO desencadeia um processo epileptogênico bastante similar ao que ocorre na ELTM-EH em humanos (BAJORAT, 2011). Quando administrada em altas doses, em roedores, por via sistêmica (~360 mg/kg), a PILO induz um quadro de alterações comportamentais com manifestação de crises motoras límbicas autossustentadas conhecido como SE (TURSKI, 1989), que se manifestam entre 15-30 minutos após injeção, e podem durar por horas. Após o SE inicia-se a epileptogênese que é dividida em fase latência e fase crônica. No período de latência ocorre uma série de alterações moleculares e celulares, tais como modificação do perfil de expressão gênica, morte neuronal, além da ocorrência de astrogliose, angiogênese, neurogênese, plasticidade neuronal e aumento da tendência à atividade sincrônica (JACOBS et al., 2009; SANTOS, 2015). O fim do período de latência ocorre quando os animais passam a manifestar as CREs que podem ser do tipo parcial simples e/ou complexas, esta fase é conhecida como fase crônica (LEITE et al., 1990; SLOVITER, 1999; CURIA et al., 2008; Leite et al., 1990). Portanto, a epileptogênese induzida por PILO culmina na conversão de um cérebro normal para um cérebro epiléptico (LEITE et al., 1990).

A associação de cloreto de lítio com a PILO algumas horas antes da administração da PILO ajuda a potencializar os efeitos da droga (HONCHAR; OLNEY; SHERMAN, 1983) fazendo com que uma dose menor de pilocarpina seja utilizada (MÜLLER et al., 2009) o que gera, conseqüentemente, redução da mortalidade dos animais.

2.3 Ritmo Circadiano

Os ritmos circadianos são ritmos biológicos que ocorrem com um período de duração de aproximadamente 24 horas estando envolvidos no controle de processos bioquímicos, fisiológicos, moleculares e comportamentais como resposta adaptativa ao ciclo de claro-escuro gerado pela rotação da Terra. Como exemplo, temos a ritmicidade da temperatura corporal, sistema hematopoiético e liberação de hormônios (por exemplo, cortisol, glicocorticoide e melatonina) (WANG et al., 2009; GERY; KOEFFLER, 2010; LI; HU; ZHOU, 2012; MATOS

et al., 2018). O padrão temporal é mantido por mecanismos endógenos que podem funcionar de forma independente a pistas ambientais, conforme observado em experimentos que simulam um ambiente constante, como o escuro contínuo. O papel das pistas ambientais é o de sincronizar o ritmo biológico (KENNAWAY, 2004; SOUZA et al, 2008) conferindo ao organismo a capacidade de se adaptar as condições externas durante as atividades necessárias na preservação da vida, por exemplo a predação (GOLDMAN, 2001; GWINNER, 2003; PEREIRA, et al, 2009; SANTOS, 2015).

O NSQ recebe sinais do ambiente, principalmente por fotorrecepção pela retina e transmite as informações recebidas por vias eferentes humorais e neurais para os osciladores periféricos (RICHTER et al., 2004; SOUZA et al, 2008), possibilitando a sincronização da temporalidade interna e externa.

No âmbito molecular, os mecanismos subjacentes à geração de ritmo, baseia-se em alças de retroalimentação, que estão interconectadas pela regulação da transcrição e tradução de genes centrais do relógio (COOMANS; RAMKISO ENSING; MEIJER, 2015). Além desta auto-regulação, esses genes sincronizam osciladores que estão distribuídos nos tecidos periféricos, mantendo-os sincronizados ao organismo (LOWREY; TAKAHASHI, 2004).

A regulação inicia através da expressão dos genes *Bmal1* e *Clock*, que ao serem traduzidos em proteínas, formam um heterodímero (CLOCK:BMAL1), promovendo a transcrição de genes alvos, incluindo genes da família *Citocromo* (*Cry1* e *Cry2*) e *Período* (*Per1*, *Per2* e *Per3*) (REPPERT; WEAVER, 2001; BOLLINGER; SCHIBLER, 2014; COOMANS; RAMKISOENSING; MEIJER, 2015). Como o mecanismo é disposto de uma maquinaria de retroalimentação, proteínas PER e CRY são repressoras do heterodímero CLOCK:BMAL1, as quais são responsáveis pela ativação da maquinaria do relógio molecular (PARTCH; GREEN; TAKAHASHI, 2014). Os genes do relógio regulam a expressão de milhares de genes alvos que, por conseguinte, apresentam expressão e função rítmicas.

As primeiras evidências do envolvimento de genes com a ritmicidade circadiana foram descritas em *Drosophila* mutantes, que apresentavam o ritmo de atividade locomotora anormal (KONOPKA e BENZER, 1971).

Embora o NSQ gere ritmos circadianos endogenamente, eles também podem ser sincronizados por sinais ambientais, conhecidos como *Zeitgebers* (doador de tempo) (TEODOR, et al., 2005). A luz é o principal *Zeitgebers* ambiental que sincroniza o sistema circadiano com o dia de 24 horas. Fatores como ritmo de vida social, alimentação, atividades

físicas são exemplos de Zeitgebers não fóticos que regulam o ritmo circadiano (REPPERT e WEAVER, 2001; ANTLE e SILVER, 2005; HOFSTRA e WEERD, 2009).

2.4 Influência da Luz

A luz é a principal pista ambiental externa usado pelo corpo para diferenciara noite do dia e assim sincronizar os ritmos circadiano. Este papel se deve provavelmente à sua capacidade de reorganizar o sistema de relógio, mesmo quando submetidos a exposições rápidas a flash (KALADCHIBACHI E FERNANDEZ, 2018). Quando a exposição à luz é desregulada os ritmos biológicos podem tornar-se dessincronizados com consequências negativas para a saúde (BEDROSIAN; NELSON, 2017).

Uma exemplo desregulação mediada pela exposição da luz é a secreção de alguns hormônios, como a melatonina, ela é secretada durante a noite e seu efeito vasodilatador faz com que a temperatura do corpo caia e outras funções fisiológicas diminuam para preparação para o sono. A luz inibe a liberação de melatonina, de modo que a alternância natural de luz e escuridão está ligada diretamente ao sistema cronobiológico do corpo (REILLY, et al., 2005).

Uma parcela da população sofre comprometimento da fisiologia circadiana ocasionada, por exemplo, em viagens para países com fusos horários diferentes. Devido a ressincronização que acontece de forma lenta para estabelecer o novo fuso horário, o indivíduo tende a apresentar perturbações do sono e desconforto gastrointestinal (BEDROSIAN; NELSON, 2017).

Estudos com humanos e modelos experimentais com animais, observaram que o *jet lag* social ou trabalho em turnos – em que a exposição à luz artificial perdura durante a noite – aumenta o risco de desenvolver doenças metabólicas crônicas, como diabetes mellitus tipo 2 e diferentes tipos de câncer, entre eles o câncer de mama (HASTINGS; REDDY; MAYWOOD, 2003; WEAVER, 2016).

2.5 Ritmo Circadiano e Doenças

Os ritmos biológicos podem tornar-se dessincronizados quando há uma desregulação dos sinais ambientais, como exemplo quando a exposição à luz é desequilibrada (com período maior ou menor em exposição a luz) ou constante, ou mediante a alterações nos genes do relógio, essa dessincronização estão relacionadas com o desenvolvimento de várias doenças (HOFSTRA; DE WEERD, 2009). Estudos em animais demonstraram que mutações ou deleções dos genes do relógio acarretam em ritmos com períodos anormais ou mesmo fenótipos

arrítmicos quando testados sob condições constantes. De fato, desregulação da ritmicidade pode afetar negativamente inúmeros processos fisiológicos e comportamentais, tais como o desempenho cognitivo, controle motor, a qualidade do sono, o estado de alerta, o metabolismo e a saúde mental (WEAVER, 2016a).

Como exemplos de doenças que podem sofrer influência do desregulamento do ritmo circadiano, como a obesidade, distúrbios metabólicos, risco cardiovascular (ROENNEBERG et al., 2012; KNUTSON; VAN CAUTER, 2008; SCHEER et al., 2009; HOFSTRA; DE WEERD, 2009), alguns tipos de câncer (GOLOMBEK et al., 2013); distúrbio inflamatório (GUPTA; SIMPSON; GUPTA, 2016); doenças neurológicas como Alzheimer (DA), Parkinson (DP) e Huntington (HDs) (HOOD & AMI, 2016).

Um exemplo da relação do ritmo circadiano com alteração no organismo foi destacado em um estudo de meta-análise associando a morte súbita com o horário do dia. De fato, há um aumento de 30% dos casos de morte súbita pela manhã e a variação circadiana contribui com cerca de 7% no total de causas (COHEN et al., 1997).

2.6 Ritmo Circadiano e Epilepsia

A epilepsia é um exemplo de doença neurológica que apresenta uma relação bidirecional com o ritmo circadiano. (WEISS, et al., 1993; ROBERTS e KEITH, 1994; STEWART et al., 2001; CHO, 2012; MIRZOEV et al., 2012). Há mais de um século atrás, Gowers classificou a ocorrência de crises como diurnas, noturnas e difusas (GOWERS, 1885). Estudos realizados posteriormente confirmaram e expandiram essas descobertas. Um Exemplo bem conhecido é a forte associação de crises no período noturno em algumas síndromes do lobo frontal (por exemplo, epilepsia do lobo frontal noturna autossômica dominante) e epilepsia mioclônica juvenil em que as crises ocorrem predominantemente após o despertar pela manhã (PARAYIOTOPOULOS et al, 1994; SCHEFFER et al, 1995).

Em pacientes, a ritmicidade circadiana de crises epilépticas parecem ser dependentes da origem e do tipo da crise (HOFSTRA et al., 2009a, b; ZAROWSKI et al., 2011). Utilizando monitoramento por vídeo-EEG, foi observado que crises parciais e temporais complexas em adultos tem pico de atividade entre as 11h e 17h, já as crises parietais durante ás 17h-23h. Crises frontais apresentaram pico de atividade específicas para a idade, em adultos de 23h-5h e em crianças 17h-23h (HOFSTRA et al., 2009a, b).

Em crianças com crises generalizadas do tipo tônico e tônico-clônica foram mais frequentes durante o sono, já as do tipo de ausência, atômica e mioclônicas apresentaram picos

em vários períodos na vigília (ZAROWSKI et al., 2011). Estudos recentes observaram que em indivíduos com ELT, o padrão circadiano das crises epiléticas apresenta distribuição uni ou bimodal (KALEYIAS et al., 2011; MIRZOEV et al., 2012; NZWALO et al., 2016)

Modelos experimentais de epilepsia também apresentam padrões circadianos de crises (FENOGLIO-SIMEONE et al., 2009; TCHEKALAROVA et al., 2010; MATZEN et al., 2012). As convulsões espontâneas em ratos são comuns durante a fase de luz do fotociclo (STEWART et al, 2001). Em ratos com epilepsia de ausência, a frequência das crises é maior nas primeiras horas da fase escura (VAN LUIJTELAAR e COENEN, 1988). Camundongos epiléticos *knockout* para o gene *KCNA1* apresentaram pico de crises no início da manhã, já a ocorrência das crises e o ritmo de atividade repouso estão inversamente correlacionados (FENOGLIO-SIMEONE et al., 2009). Em estudos com roedores com epilepsia límbica, observou-se que a ocorrência de crises espontâneas ocorreu preferencialmente durante a exposição à luz (CAVALHEIRO et al, 1997; GORTER et al, 2001).

Notavelmente, Quigg et al., (2000) demonstraram por meio de estudos em modelo experimental, que a periodicidade circadiana das crises se mantém mesmo em condições de escuro constante, sugerindo uma dependência do sistema de controle do relógio endógeno para o limiar das CREs.

2.7 A interação entre o sistema de controle do ritmo circadiano e a epileptogênese ocorre de forma bidirecional.

Por um lado, as crises epiléticas podem alterar os padrões circadianos de diferentes processos comportamentais e fisiológicos. Em modelos experimentais de ELTM, foi observado mudanças nos padrões circadianos de atividade locomotora e temperatura corporal semanas após o SE e/ou na fase crônica da epilepsia (QUIGG et al., 2001; STEWART; LEUNG, 2003; PITTSCH et al., 2017). As crises desencadeadas eletricamente provocaram mudanças agudas nos ritmos de temperatura (QUIGG et al., 2001). Ratos epiléticos têm atraso de fase no ritmo de atividade locomotora, e este atraso correlaciona-se com a ocorrência de crises (STEWART e LEUNG, 2003).

Estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, em modelo de epilepsia induzida por Lítio-PILO intraperitoneal, mostrou que os genes do relógio apresentam expressão alterada nas fases pós SE e em ratos epiléticos, mantidos ao ciclo claro-escuro (12h/12h). A expressão de *Bmal1*, *Per1* e *Per2* foi mantida em ratos epiléticos, enquanto *Per3* apresentou um perfil arritmico na fase epilética. *Cry1* e *Cry2* estava ausente na fase pós SE, porém seu perfil foi

recuperado na fase epiléptica (MATOS et al., 2018). Essas alterações nos genes do sistema temporizador circadiano podem contribuir para explicar os mecanismos que levam a alteração de ritmicidade e aparecimento de determinadas comorbidades no processo epileptogênico.

Por outro lado, numa relação inversa, alterações no ritmo circadiano podem modular o processo epileptogênico. A alteração do fotoperíodo claro/escuro 12h/12h para o fotoperíodo de 18h/6h reduziu o limiar para crises clônicas induzidas por Pentilenotetrazol (PTZ) (TAHSILI-FAHADAN et al., 2008).

Alteração do ritmo em modelos *knockout* mostram a importância de genes do oscilador central no limiar de crises e da epileptogênese. GERSTENER et al., (2014) em um estudo com o fotoperíodo de 14h/10h (claro/escuro) mostram que na fase escura há um limiar menor para que o estímulo evoque uma crise. Camundongos *knockout* BMAL1 mostraram uma redução do limiar para o início das CREs tanto na fase clara e escura, sugerindo assim que tanto a alteração do ritmo pela luz quanto pela deleção de BMAL1 estão envolvidos na ocorrência das crises.

Neste sentido é importante elaborar ensaios com modelos de epilepsia e alteração e/ou perda de ritmo circadiano em laboratório, utilizando protocolos de manipulação de sincronizadores externos. Animais mantidos em livre-curso, ensaios funcionais com animais *knockdown* e *knockout* e utilização de diferentes Drogas Antiepiléticas (DAEs) em diferentes períodos do ritmo circadiano tem sido úteis (MARQUES, 2018).

Tomando como bases a literatura, que vem demonstrando uma relação da luz na dessincronização do ritmo, bem como a ocorrência das crises epiléticas, que apesar de imprevisíveis, apresentam perfil de oscilação de ocorrência diurno, este trabalho objetivou avaliar o efeito da exposição a luz constante durante o processo epileptogênico.

Este é o primeiro estudo que analisa a influência do claro constante na fase da epileptogênese, investigar e compreender a natureza bidirecional da relação da epilepsia com o ritmo circadiano pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas como a cronoterapia, que pode trazer imensos benefícios aos pacientes portadores de algum tipo de síndrome epilética, bem como aqueles pacientes refratários ao tratamento medicamentoso (CHO, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da exposição de luz constante no processo epileptogênico.

3.2 Objetivo Especifico

- Avaliar o ritmo de atividade locomotora de ratos Wistar (*naïves* e epiléticos) submetidos ao claro constante.
- Avaliar o perfil da frequência e gravidade das crises epiléticas no modelo experimental de Litio-PILO mantidos em claro constante.
- Correlacionar o perfil de crises recorrentes e espontâneas com a interferência/perda do ritmo da atividade locomotora em animais mantidos em claro constante.

Mediante os objetivos apresentados, a hipótese deste trabalho é que as CREs são alteradas pela exposição ao claro constante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estabelecimento dos Grupos Experimentais

4.1.1 Animais

Ratos *Wistar* (n=46) machos com 45 dias de vida, pesando entre 150 a 250 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (Biocen - UFAL) foram utilizados. Os animais foram alocados em gaiolas grandes (4 animais por gaiolas), mantidos a temperatura de 22 °C e submetidos inicialmente ao ciclo claro/escuro de 12h/12h, com livre acesso a água e comida.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações normativas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFAL, com protocolo de número 17/2017 (Anexo A). Todas as medidas possíveis para diminuir o sofrimento dos animais foram tomadas.

- Ambientação

Imediatamente após a chegada em nosso laboratório, todos animais passam por um período de 2 semanas de ambientação em condições normais (ciclo de claro-escuro 12h/12h) em nosso biotério. As luzes foram acesas as 6h e apagadas às 18h.

- Tratamento em claro constante

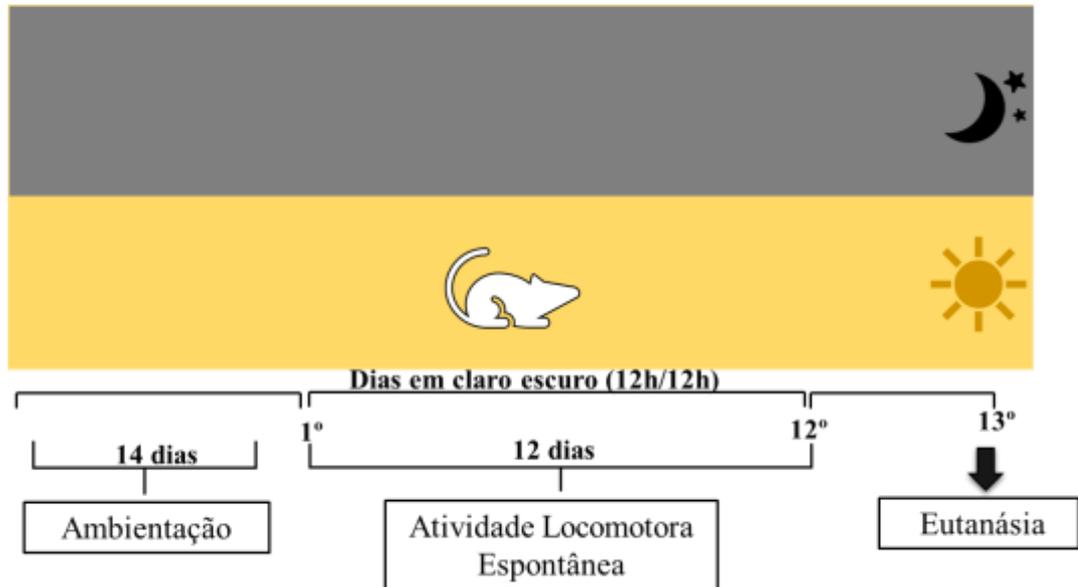
Os animais submetidos a este protocolo foram expostos ao claro constante (24hs/dia) após o período de ambientação. Todos os procedimentos experimentais destes animais foram realizados nestas condições desde a indução do SE até a eutanásia. O biotério setorial do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) foi totalmente preparado para alojar os animais na condição de claro constante. Lâmpadas de emergência foram instaladas e o monitoramento da sala foi feito diariamente. Usamos um luxímetro (Digital lux meter – luxímetro digital MLM – 1011), para verificar a incidência de luz e poder comprovar que a sala estava na condição ideal. A incidência de luz medida foi de 788 lux.

4.1.2 Grupos Experimentais

- Animais *naïves* C/E (n=10)

Grupo mantido em ciclo claro-escuro de 12h/12h, composto por animais que não foram submetidos ao SE.

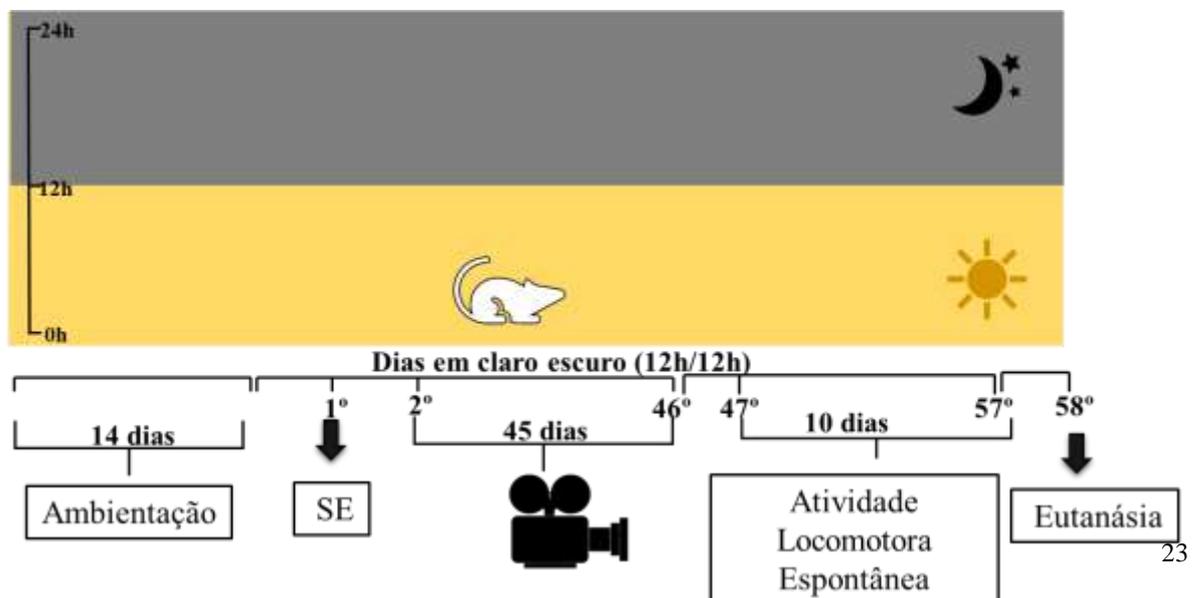
Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental para o grupo *naïve* C/E.



- Animais epilépticos C/E (n=13)

Grupo mantido em ciclo claro-escuro de 12h /12h, composto por animais submetidos ao SE e monitorados por um período de 55 dias após o SE para avaliação das CREs e análise da atividade locomotora.

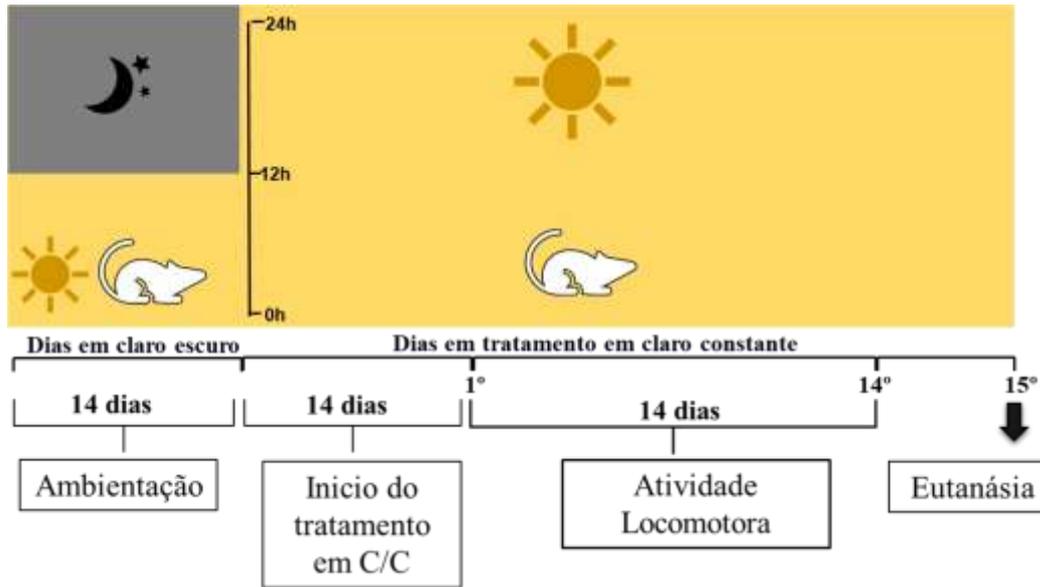
Figura 2. Representação esquemática do delineamento experimental para o grupo epiléptico C/E.



- Animais *naïves* C/C (n=10)

Grupo mantido em ciclo claro constante, composto por animais que não foram submetidos ao SE.

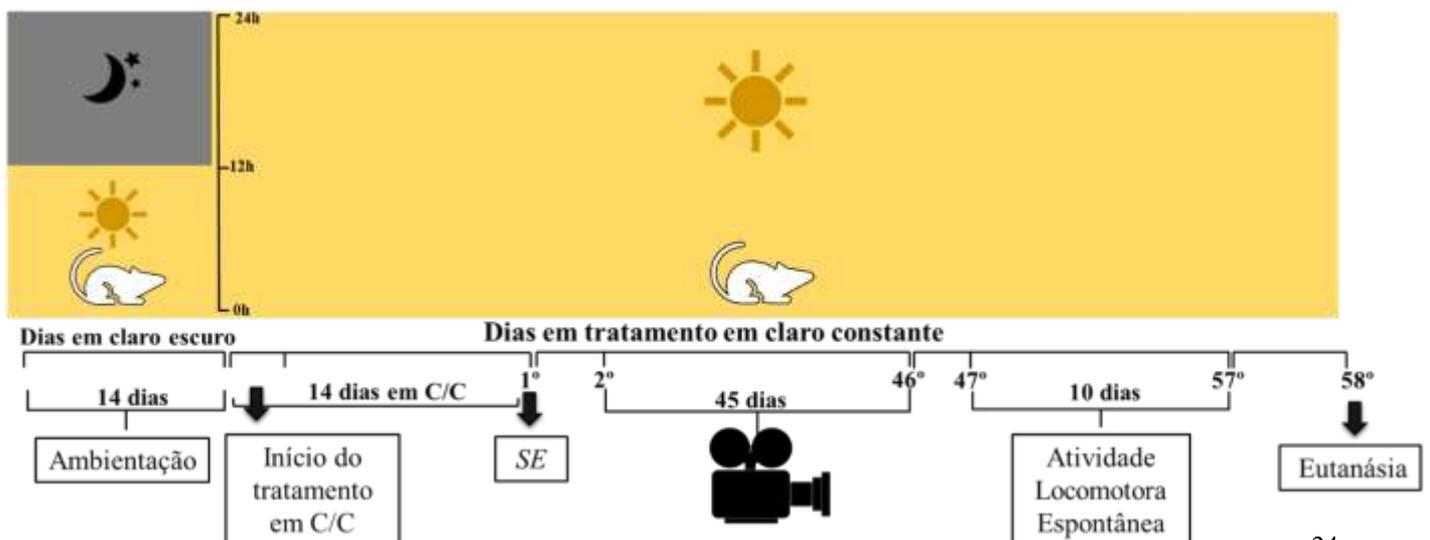
Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental para o grupo *naïve* C/C.



- Animais epiléptico C/C (n=13)

Grupo mantido em ciclo claro constante durante todo protocolo experimental, composto por animais submetidos ao SE, mantidos por um período de 45 dias após o SE para o desenvolvimento das CREs e mais 14 dias para análise da atividade locomotora.

Figura 4. Representação esquemática do delineamento experimental para o grupo epiléptico C/C.



Todos os grupos experimentais foram mantidos no biotério setorial do LBCM, no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), UFAL.

4.2 Protocolo usado para estabelecimento do modelo de ELTm

- Indução do *Status Epilpeticus*

O protocolo de indução do *Status Epilpeticus* (SE) utilizado foi modelo químico de cloreto de Lítio-pilocarpina (Lítio-PILO). Inicialmente os animais foram submetidos à injeção intraperitoneal (i.p.) de cloreto de lítio (127mg/kg) e aproximadamente 18 horas após a aplicação de cloreto de lítio foi administrado butilbrometo de escopolamina (1mg/kg, i.p.), em seguida, após um período de 30 minutos os animais foram tratados com pilocarpina (30mg/kg, i.p.). Para reverter as crises, os animais foram tratados com diazepam (5mg/kg, i.p.) a cada 30 min, até que as crises fossem abortadas completamente. Nos 3 dias seguintes ao SE, quando necessário, foi realizada reposição hidroeletrólítica com soro fisiológico (0,9%) e soro glicosado (5%) i.p.

Os animais foram mantidos em SE durante um período de 90 minutos. O SE foi considerado após a ocorrência de crises sustentadas de nível ≥ 3 , de acordo com a escala de Racine (1972) (Tabela 2) por um período de pelo menos 5 minutos (SHORVON, 1994; LOWENSTEIN e ALLDREDGE, 1998). Imediatamente após a administração de pilocarpina, os animais foram videomonitorados utilizando uma filmadora digital (DCR-SR68, Sony Brasil LTDA).

4.3 Avaliação das CREs

No primeiro dia após o SE os animais foram acondicionados individualmente em gaiolas de acrílico e monitorados por câmera filmadora digital (DCR-SR68, Sony Brasil LTDA) 24 horas por dia por um período de 45 dias, para a detecção da latência da primeira CRE, severidade, frequência e duração das CREs. A caracterização da fase crônica foi baseada na ocorrência de pelo menos duas crises de nível 3 com base na classificação de crises límbicas estabelecidas por Racine (RACINE, 1972) representada na tabela 1.

Neste estudo, utilizamos a janela temporal de 15 dias para as análises das CREs, avaliamos então a quantidade e gravidade das crises

Tabela 1 - Escala comportamental de crises límbicas de Racine (1972).

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

Racine (1972)

4.4 Avaliação da Atividade Locomotora Espontânea

Os animais foram alocados individualmente no Sistema ALE. O Sistema permaneceu detectando movimentos ao longo de um período de 10 (grupo crônico), 14 (grupo *naïve* C/C) e 12 dias (grupo *naïve* C/E).

Os sensores de movimento infravermelho detectam qualquer movimento dentro da gaiola. Eles foram colocados 15 cm acima das tampas da gaiola e registraram automaticamente o tempo de movimento em um computador a cada 5 minutos pelo sistema SAP (Dr. Marconi Câmara Rodrigues, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil, 2011). Os grupos *naïves* foram alocados no sistema 14 dias após ambientação e os grupos epiléticos 45 dias após o *SE*.

4.5 Análise Estatística

A análise ALE foi realizada utilizando o *software El Temps* (Dr. Antoni Diez-Noguera, Universidade de Barcelona, Barcelona, Espanha, 1999). O *software Acrophase* (<http://www.circadian.org/software.html>) foi usado para a análise de padrões circadianos. Um $p < 0,05$ foi tomado como indicativo da presença de um ritmo com o período de 24 h. A Acrophase

(ACRO) realiza uma regressão de cossinor para ajustar os dados do tempo-curso a uma função cosseno que ocorre em um período de 24 horas.

As análises estatísticas para as crises foram realizadas por meio de Análise de Variância (ANOVA) seguida por teste Bonferroni. Quando um único parâmetro foi comparado entre dois grupos diferentes, o teste *t* Student foi empregado seguindo teste paramétrico ou não paramétrico. Foi utilizando a plataforma *GraphPad Prism*, versão 5,02 (*GraphPad, USA*). Os dados estão representados como a média \pm erro padrão (\pm SEM). Os resultados com valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

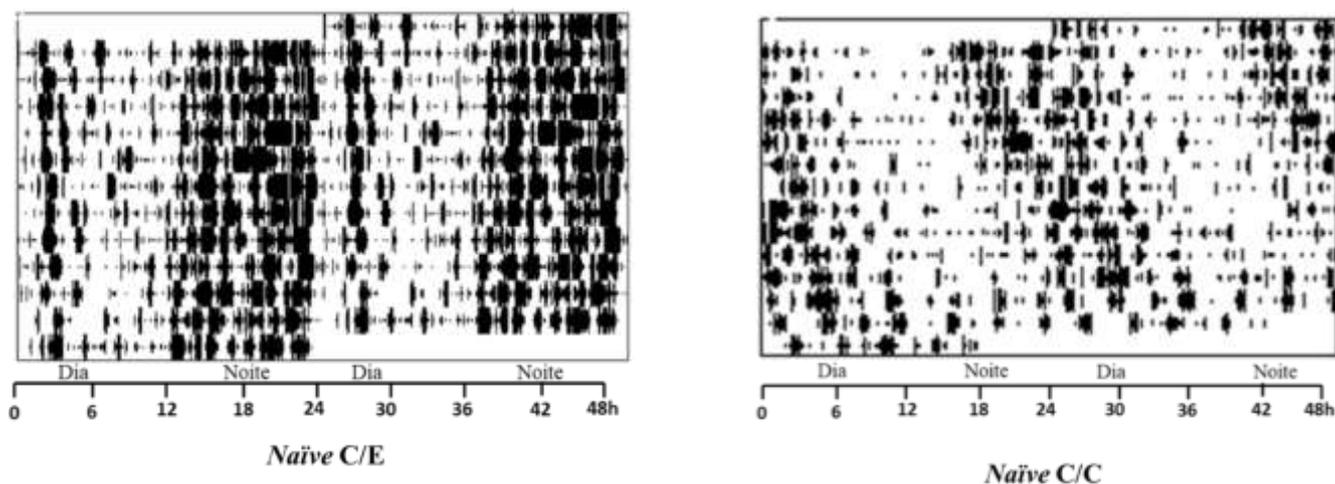
5.1 Análise da exposição ao Claro Constante na Alteração do Ritmo da Atividade Locomotora

Inicialmente avaliamos se o tratamento de duas semanas em claro constante seria suficiente para alterar o ritmo circadiano dos animais. Utilizamos como marcador biológico da ritmicidade a ALE.

A figura 5 informa um actograma representativo da atividade locomotora dos grupos *naïves* C/C e C/E. Observamos pelos registros que o grupo *naïves* C/E apresentaram um padrão de atividade durante todo o dia, sendo o período claro representando pelo intervalo de 0-12h, (sendo “0h” o momento em que as luzes foram acesas às 6 horas e “12h” o momento que as luzes foram apagadas às 18 horas) de menor atividade e o período escuro do dia (intervalo de 12-24h), o de maior atividade locomotora. Entretanto, os animais submetidos ao tratamento claro constante não apresenta o mesmo padrão de atividade em comparação ao C/E. Nos primeiros dias observamos que existe um período de 12h com maior atividade e 12h com menor atividade, porém com um atraso para o seu início e fim de atividade. Esse padrão perdura até nono dia de análise. A partir do 10º dia o padrão torna-se fragmentado indicando um desacoplamento da ritmicidade circadiana da atividade locomotora.

De fato, a exposição a luz constante provoca dessincronização de neurônios. Um grupo de camundongos transgênicos *Per1:GFP* tiveram atraso de atividade quando submetidos ao tratamento de luz constante (entre 3 a 5 meses), entretanto essa exposição não comprometeu a ritmicidade da atividade locomotora circadiana(OHTA, et al., 2005).

Figura 5 – Actograma em duploplote representativo da análise da atividade locomotora nos grupos experimentais.



Visto que, nos últimos dias de análises os animais do grupo *naïve* C/C apresentaram uma fragmentação no padrão de atividade, realizamos então uma análise da atividade locomotora dos cinco últimos dias separado por animal (Tabela 2), como resultado observamos que todos os animais, exceto o rato 2, apresentaram perda da ritmicidade da atividade locomotora nos últimos dias.

Tabela 2 – Análise da ritmicidade individual do grupo *naïve* C/C nos últimos cinco dias de atividade locomotora.

Animais	Dias de Análises				
	10º	11º	12º	13º	14º
Rato 1	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Rato 2	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Rato 3	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho
Rato 4	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho
Rato 5	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho
Rato 6	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Rato 7	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Vermelho
Rato 8	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho
Rato 9	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Rato 10	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Vermelho

Tabela demonstrativa das análises dos cinco últimos dias de atividade locomotora do grupo *naïve* C/C. Em **amarelo** (animais com ritmo) e em **vermelho** (animais que tiveram perda da atividade ritmicidade locomotora espontânea), as análises foram realizadas utilizando o programa Acrophase, onde $p < 0,05$ foi indicativo da perda da ritmicidade da atividade locomotora.

5.2 Análise da Exposição ao Claro Constante na Epileptogênese e Ritmicidade da Atividade Locomotora

Após a confirmação que duas semanas de tratamento em claro constante seria suficiente para desacoplar o ritmo circadiano dos animais, buscamos então avaliar o efeito desta alteração na epileptogênese.

Para isto, avaliamos a quantidade de animais que desenvolveram CREs durante o período de quinze dias de análise contados a partir do sétimo dia após o SE. O critério que utilizamos para definir as CREs foi a ocorrência de pelo menos duas crises de nível 3 com base na classificação de crises límbicas estabelecidas por Racine (RACINE, 1972)

A figura 6 apresenta a proporção dos animais que apresentaram CREs para cada grupo experimental. Podemos observar que 87% (n=12) dos animais do grupo epilético C/C apresentaram CREs, comparado com 57% (n=8) do grupo epilético C/E. Este dado indica o tratamento em claro constante facilita a epileptogênese, diminuindo o limiar para aparecimento das CREs.

A literatura tem mostrado que uma alteração no ritmo circadiano mediante modulação do fotoperíodo pode diminuir o limiar para indução de crises agudas (TAHSILI-FAHADAN et al., 2008), entretanto, até onde sabemos, este é a primeira evidencia de que uma alteração no ritmo pode facilitar a epileptogênese induzida por meio do SE.

O processo que leva a conversão do cérebro normal a um cérebro epilético envolve diferentes processos biológicos (DEVINSKY et al., 2018), que são regulados pelo ritmo circadiano (CHAUDHURY et al., 2005; TAMAI et al., 2008; O'CALLAGHAN et al., 2012; IKENO et al., 2013, 2014). É possível, portanto, que alteração no ritmo, avaliado pela fragmentação da atividade locomotora, tenha encurtado a etapa de latência. Para modelos de crises induzida por Pentilenotetrazol (PTZ), após alteração do fotoperíodo claro/escuro 12h/12h para o fotoperíodo de 18h/6h, houve uma redução no limiar para crises clônicas (TAHSILI-FAHADAN et al., 2008).

Figura 6 – Proporção das CREs nos grupos experimentais.

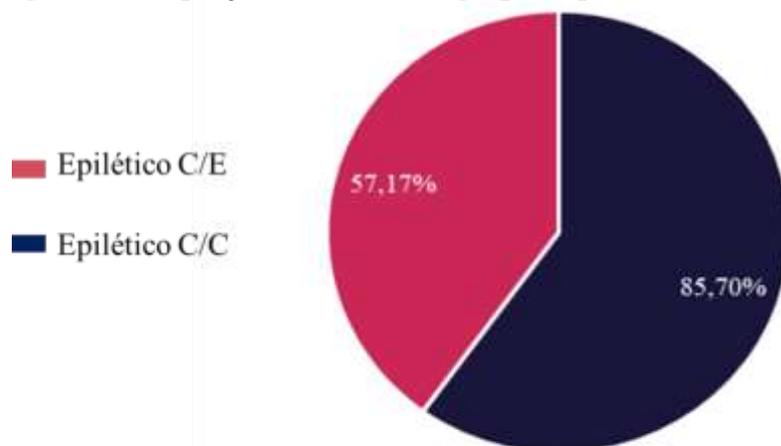


Figura demonstrativo das proporções de animais que apresentam CREs. Em Rosa (animais submetidos ao ciclo de claro –escuro, n=8) e em azul (animais submetidos ao ciclo claro constante, n=12).

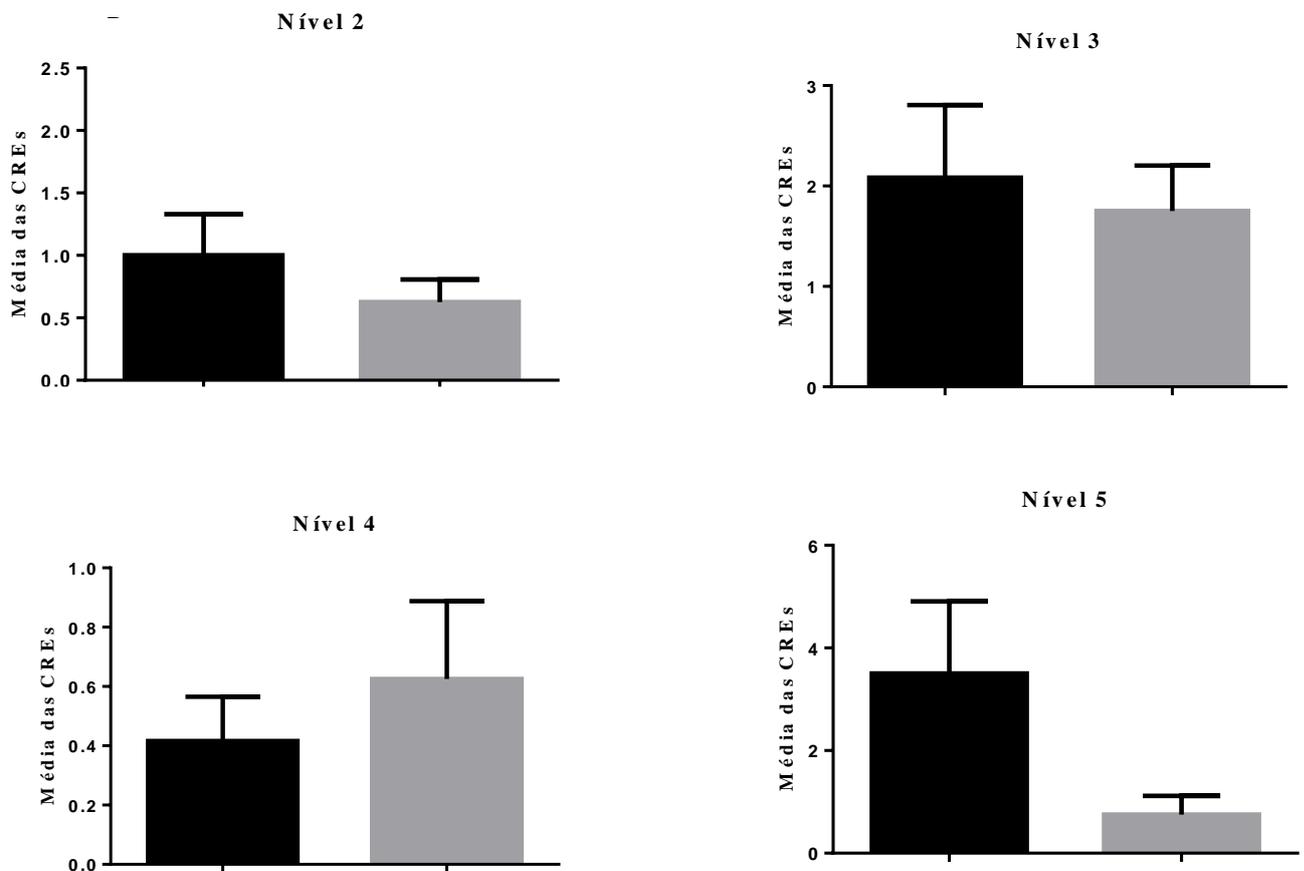
Em seguida avaliamos o perfil das crises nos grupos experimentais epiléticos. A figura 7 apresenta os resultados referentes a média total e a gravidade das crises durante 15 dias de análises para cada grupo experimental. Observamos que apesar do grupo C/C ter apresentado um total de crises maior (83 crises) que o grupo C/E (29 crises), as médias totais das crises não foram significativamente diferentes entre os grupos experimentais. O mesmo aconteceu para a gravidade das crises. Entretanto, o grupo epilético C/C apresentou tendência para crises mais graves (Nível 5) em comparação ao C/E (valor de $p < 0,0556$).

Estudos mostram que, as crises epiléticas ocorrem em padrões diurnos e circadianos, sugerindo uma provável influência do ritmo na epilepsia (TCHEKALAROVA et al., 2010; MIRZOEV et al., 2012; VAN NIEUWENHUYSE et al., 2015; NZWALO et al., 2016). Em pacientes com ELT observa-se que a maior frequência de CREs ocorrem durante o período vigília, com pico as 15 horas (QUIGG et al., 1998). Pacientes com ELT apresentaram crises com maior frequência período da tarde entre as 15h as 19h (PAVLOVA et al., 2004). Evidências mostram maior frequência de crises em pacientes como ELT também foram relatadas com picos de manhã e no final da tarde (DURAZZO et al., 2008; KARAFIN et al., 2010). Os dados encontrados na literatura, mostram até então uma certa incidência na fase clara do dia.

Morimoto et al (1985) relataram um caso de um paciente com epilepsia, na qual as crises apresentadas se tornaram marcadamente mais frequentes na exposição à luz ou banho quente, esses achados foram obtidos enquanto o paciente estava internado em um ambiente hospitalar.

Figura 7 - Média total e nível de CREs dos grupos experimentais.





Médias totais de crises e de cada nível de crise em 15 dias de análises. A barra preta representa o grupo Epilético C/C e a barra em cinza o grupo epilético C/E. Para medias totais grupo epilético C/C (n=83 e grupo epilético C/E (n=29). Para os níveis de crise o grupo epilético C/C (Nível 2, n = 11; nível 3, n=25; nível 4, n = 5; nível 5, n = 42) e grupo epilético C/E (Nível 2, n = 5; nível 3, n = 14; nível 4, n =5; nível 5, n = 5). Os dados foram expressos em médias \pm S.E.M, Mann Whitney test (* = $p < 0,05$).

Para compreender de que forma a exposição ao claro constante interfere no ritmo circadiano dos animais epiléticos, avaliamos a ALE 45 dias após a indução do SE. Essas análises foram realizadas durante 10 dias.

A figura 8 mostra o actograma representativo em duploplote da atividade locomotora dos grupos epilético C/E e C/C. Podemos observar que, há uma maior intensidade da atividade em períodos do dia no grupo epilético C/E em relação ao *naïve* C/E (Figura 8A e 5A, respectivamente), isto mostra de forma qualitativa que a epilepsia sozinha afeta o ritmo, aumentando a frequência e a intensidade da atividade locomotora. Este dado corrobora com estudos do nosso grupo, onde além de observar essa mudança no comportamento locomotor de forma quantitativa, verificou-se também que os animais epiléticos C/E apresentaram um início

da atividade mais precoce em comparação com os animais *naïve* C/E (MATOS, et al., 2018). Este atraso, assim como as outras mudanças no ritmo de atividade locomotora podem estar correlacionadas com a ocorrência de crises, resultando em alteração do ritmo circadiano (STEWART e LEUNG, 2003; MATOS, et al., 2018).

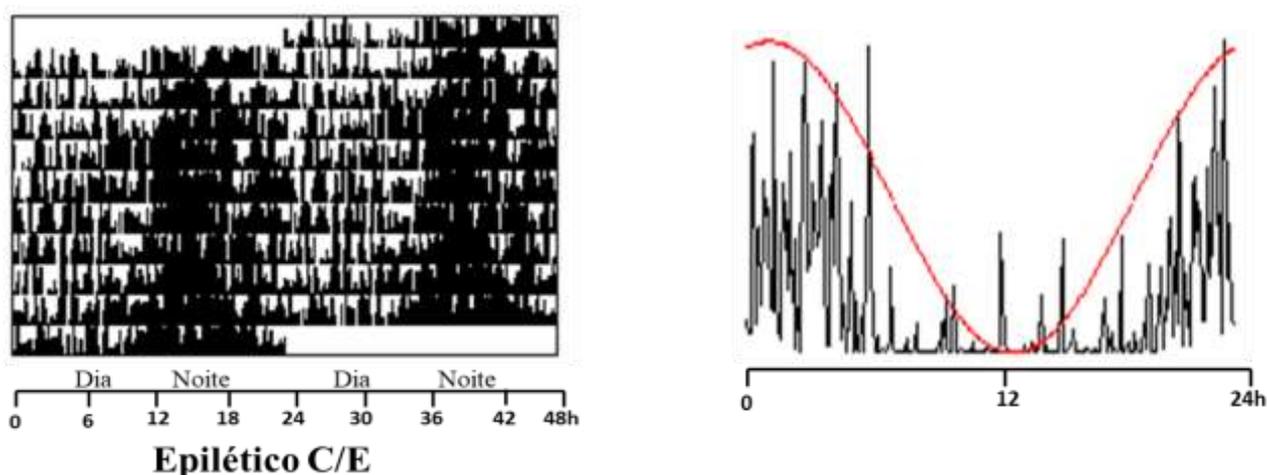
Pesquisas envolvendo genes do relógio circadiano mostram resultados marcantes, um estudo com animais *knockout* *BMAL1*, gene diretamente envolvido no estabelecimento dos ritmos circadianos, a perda de *Bmal1* em camundongos resulta em comprometimento da atividade locomotora, além da perda da ritmicidade circadiana e reduz os níveis de atividade em escuro constante (BUNGER et al., 2000).

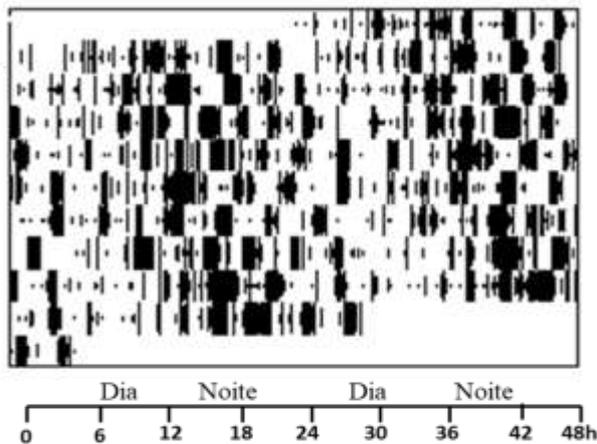
Interessantemente, 46% (n=4) dos animais do grupo epilético C/C tiveram perda da ritmicidade da atividade locomotora, como comprovado no actograma (Figura 8B e 8C) e no períodograma. Este representado na forma de onda de atividade com a curva de ajuste de cosseno (vermelho) com perda da ritmicidade da atividade locomotora. Epilético C/C arrítmico (Média = 28,875; $p > 0,05$) e Epilético C/C Rítmico (Média = 42,889; $p < 0,02$).

Estudo com camundongos transgênicos para *Per1* com exposição a luz constante (no período de 3 a 5 meses) resultou tanto em camundongos arrítmicos quanto rítmicos com período de corrida alongado (OHTA; YAMAZAKI; MCMAHON, 2005).

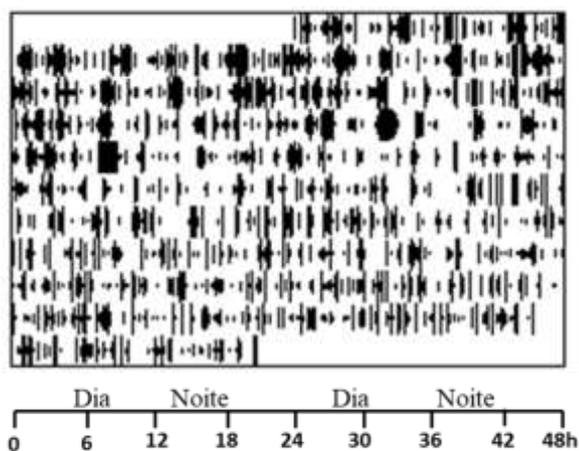
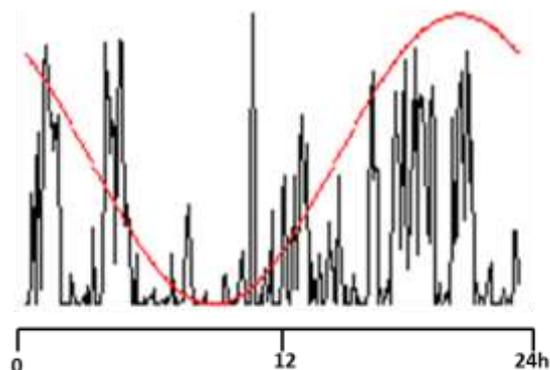
Não há na literatura estudos que correlacione a exposição contínua, um período superior a 45 dias, ao claro constante em animais epiléticos. Esse é o primeiro estudo que avalia a influência do claro constante na epileptogênese induzida por SE.

Figura 8 – Gráfico na forma de onda e actograma representativo da análise da atividade locomotora nos grupos experimentais.

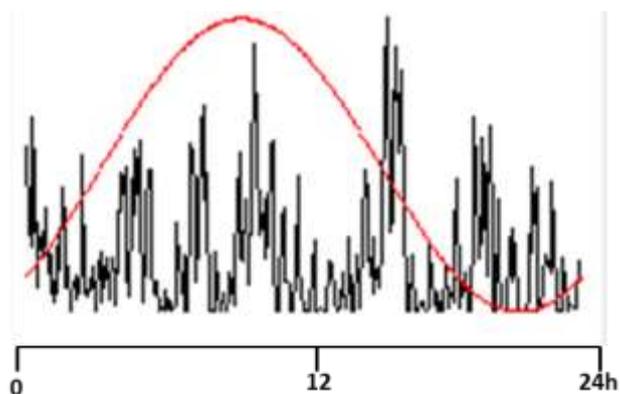




Epilético Rítmico C/C



Epilético Arrítmico C/C



A esquerda actograma duplicado representativo dos grupos experimentais analisados e a direita gráficos representativos na forma de onda de atividade com a curva de ajuste de cosseno (vermelho). Teste estatístico realizado pelo software Acrophase e El Temps, (Epilético rítmico C/C e Epilético C/E, $p > 0,02$; Epilético arrítmico C/C $p < 0,05$).

Uma vez que a exposição a luz constante levou a um desacoplamento da ritmicidade circadiana da atividade locomotora em 46% dos animais, decidimos avaliar se o efeito (figura 8) apresenta uma correlação com as CREs.

Para avaliar o efeito do claro constante no perfil das crises, subdividimos o grupo epilético C/C em dois subgrupos: Epilético C/C arritmico e Epilético C/C rítmico, analisamos então a gravidade e frequência das crises em comparação ao grupo epilético C/E. A figura 9 apresenta os resultados referente à média total e a gravidade das crises durante 15 dias de análises. Observamos que o grupo Epilético C/C arritmico (n=4) apresentou maior incidência de CREs (valor de $p < 0,008$) em comparação com os outros grupos.

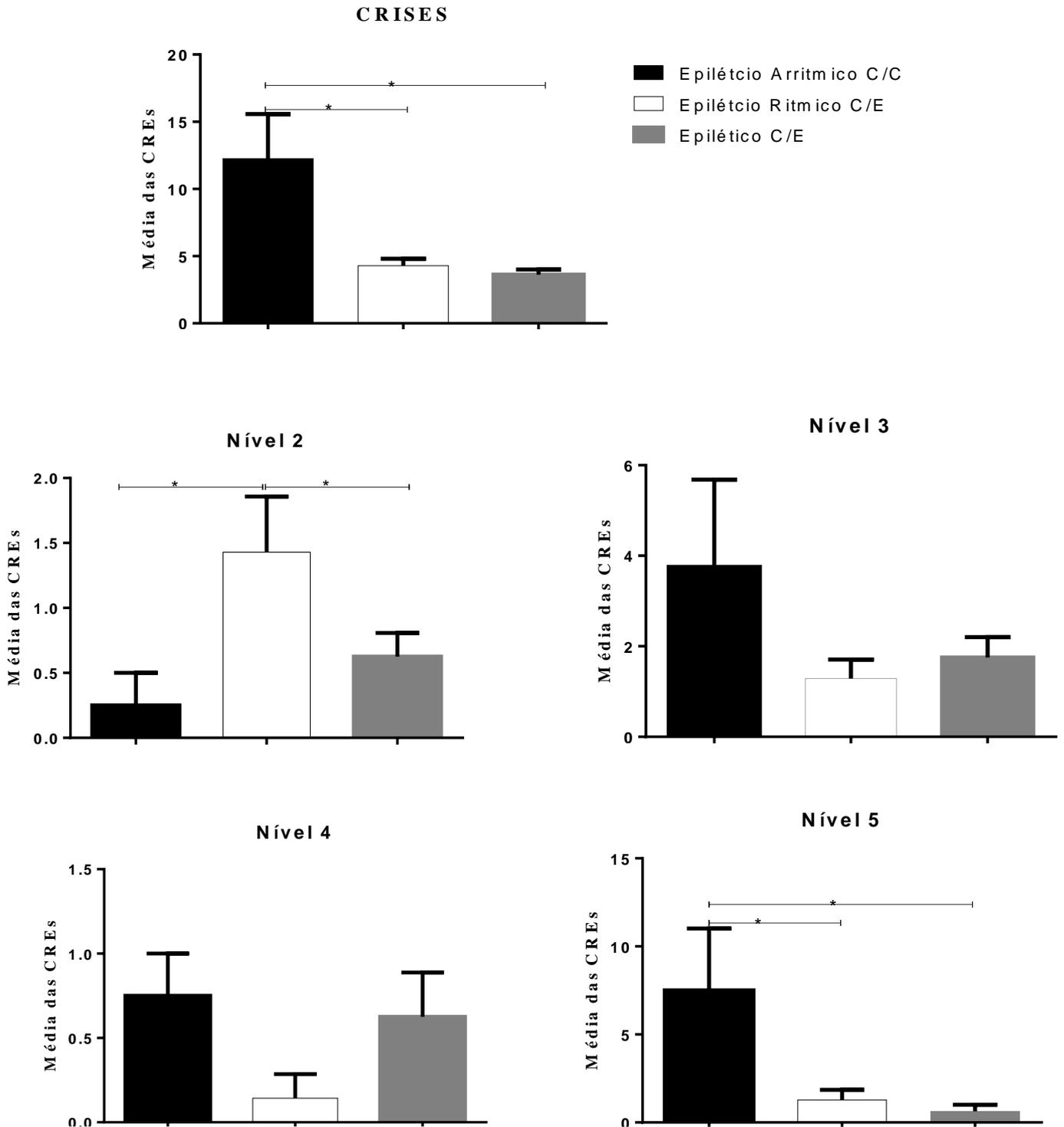
No que se refere a gravidade das CREs, observamos que as crises do nível 2 ($p < 0,0133$) e 5 ($p < 0,0123$) foram significativamente diferentes entre os grupos analisados. Os animais arritmicos apresentaram maior prevalência de crises de nível 5 em comparação aos outros grupos, diferentemente dos animais que não perderam o ritmo que (n=7) tiveram com maior prevalência crises de nível 2.

Mediante esses resultados, podemos sugerir que a exposição ao claro constante pode causar perda da ritmicidade da atividade locomotora dos animais epiléticos e o desacoplamento do ritmo pode estar relacionado com a gravidade das CREs.

A exposição ao claro constante não causou perda da ritmicidade da atividade locomotora de todos os animais utilizados neste trabalho, destes 54% tiveram somente arrastamento do ritmo. É possível que o tempo exposto ao claro constante não tenha sido suficiente para alterar completamente o ritmo desses animais, ou eles possuam alguma resistência endógena. São necessário estudos mais refinados para tentar elucidar esse fenômeno, como estudos moleculares na busca de entender melhor a associação entre epilepsia e o claro constante.

Apesar dos resultados, até o momento, não comprovarem mudança no perfil das crises de forma significativa, este é o primeiro estudo que analisa a influência do claro constante na gravidade das crises durante a fase crônica da epilepsia, por um período de observação 24h por dia. Os mecanismos que fazem com que os animais submetidos ao tratamento de claro constante apresentem tendência para crises mais graves em comparação ao ciclo claro escuro pode ser ocasionado por diferentes mecanismos, visto que as alterações circadianas em animais expostos a fotoperíodos distintos, são diferentes. Os dados apresentados mostram uma certa influência do fator externo, neste caso a luz, na gravidade das CREs.

Figura 9 - Análise das CREs dos animais rítmicos, arrítmico C/C e epilético C/E.



Médias totais de crises e de cada nível de crise em 15 dias de análises. A barra em cinza representa o grupo epilético em ciclo de claro-escuro (12h/12h), a barra em branco os animais em ciclo de claro constante com ritmo e a barra em preto animais em ciclo de claro constante que tiveram perda da ritmicidade da atividade locomotora. As análises estatísticas foram realizados por One-way ANOVA, seguido do Bonferroni's post hoc. * $p < 0.05$.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, nosso estudo sugere que a exposição a luz constante pode facilitar a epileptogênese e o desacoplamento pode agravar a frequências das crises recorrente e espontâneas.

Estudos relacionados às vias moleculares subjacentes a essa associação são necessários para o melhor esclarecimento dessa interação.

7 REFERÊNCIA

ANDRADE-VALENÇA, L. P. A., et al. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, Fev. v. 12, n.1, 2006.

ANTLE, M. C.; SILVER, R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci*, v. 28, n. 3, p. 145-51, 2005.

ARIDA et al. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Research*, v.34, p.99-107, 1999.

BAJORAT, R. et al. Seizure frequency in pilocarpine-treated rats is independent of circadian rhythm. *Epilepsia*, v.52, n. 9, p. 118-122, 2011.

BARCA-MAYO O. et al. Astrocyte deletion of Bmal1 alters daily locomotor activity and cognitive functions via GABA signalling. *Nature Communications*, v. 8, p. 14336, 2017

BAZIL, D. C.W.; SHORT, D.; CRISPIN, W. Z. Patients with intractable epilepsy have low melatonin, which increases following seizures. *Neurology*, v. 55, p. 1746-1748, 2000.

BERCOVICI, E.; KUMAR, B. S.; MIRSATTARI, S. M. Neocortical temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research and treatment*, v. 29, n. 5, p. 366-70, 2012.

BUNGER, M. K. et al. *Mop3* Is an Essential Component of the Master Circadian Pacemaker in Mammals. *Cell*. v.103(7): p.1009–1017, 2000.

CAVALHEIRO E.A. et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*, v. 32. n. 6, p.778–82, 1991

CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. Ital, *Journal of the Neurological Sciences*, v.16, n.1-2, p.33-7, 1995

CHO, C. H. Molecular mechanism of circadian rhythmicity of seizures in temporal lobe epilepsy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v.6, n.55, 2012.

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

CURIA, G., et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of neuroscience methods*, v.172, n.2, p.143-57, Jul. 2008.

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

ENGEL J. J.; SHIELDS WD. Surgically remediable syndromes. In: Engel JJ, Peddley TA, editors. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 1687-96. 1997

ENGEL J. Jr. Concepts of epilepsy. *Epilepsia*. v. 36. Suppl 1:S23-9, 1995.

ENGEL J., MESIAL J. Temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist*, *Neuroscientist*. Agos, v. 7, n. 4, p. 340-52, 2002.

ENGEL, J. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist*, v.7, p.340-52, 2001.

FENOGLIO-SIMEONE, K. A., et al. Ketogenic diet treatment abolishes seizure periodicity and improves diurnal rhythmicity in epileptic Kcna1-null mice. *Epilepsia* v. 50, p. 2027–2034, 2009.

FERNANDES, M. J. S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. *Estudos Avançados*, v. 27, n. 77, 2013.

FIEST, K. M., et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-

analysis of international studies. *Neurology*, v. 88, n. 3, p. 296-303, 2016.

FISHER, R. S., et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, v. 55, p. 475-82, 2014.

FISHER, R. S., et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, v. 58, n. 4, p. 522–530, 2017.

FRENCH, J.A.; WILLIAMSON, P.D.; THADANI, V.M.; et al. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: results of history and physical examination. *Annals Neurology*. 1993. v. 34, p. 774.

GERRY, S.; KOEFFLER, H. P. Circadian rhythms and cancer. *Cell Cycle*, v. 9, p. 1097-1103, 2010.

GERSTNER, J. R. et al. BMAL1 controls the diurnal rhythm and set point for electrical seizure threshold in mice. *Frontiers Systems Neuroscience*, v. 8. p. 121, 2014.

GITAÍ, D. L. G., et al. Chronobiology of limbic seizures: Potential mechanisms and prospects of chronotherapy for mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 98, p. 122-134.

GOLDMAN, B.D. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal Biological Rhythms*, v.16, p.283-301, 2001.

GOLOMBEK, D. A. et al. The times they're a-changing: Effects of circadian desynchronization on physiology and disease. *Journal do Physiology-Paris*, v. 107, p. 310-322, 2013.

GORTER J.A. et al. Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-

immunoreactive neurons. *European Journal of Neuroscience*. 13, n.4, p. 657–69. 2001.

GOWERS W. Course of epilepsy. In: Gowers W, editor. *Epilepsy and other chronic convulsive diseases: their causes, symptoms and treatment*. New York: William Wood. p. 157–64, 1885

GUPTA, M. A.; SIMPSON, F. C.; GUPTA, A. K. Psoriasis and sleep disorders: A systematic review. *Sleep Medicine Reviews*, v. 29, p. 63-75, 2016.

GWINNER, E. Circannual rhythms in birds. *Current opinion in Neurobiology*, v.13, p.770-778, 2003

hipocampal. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, v.12, n.1, 2006.

HOFSTRA, W. A. et al. Diurnal rhythms in seizures detected by intracranial electrocorticographic monitoring: an observational study. *Epilepsy Behav.* 14, 617–621, 2009b.

HOFSTRA, W. A. et al. Timing of temporal and frontal seizures in relation to the circadian phase: A prospective pilot study. *Epilepsy Research*, v. 94, n. 3, p. 158–162, 2011.

HOFSTRA, W. A.; DE WEERD, A. W. The circadian rhythm and its interaction with human epilepsy: A review of literature. *Sleep Medicine Reviews*, v. 13, n. 6, p. 413–420, 2009.

HONCHAR, M. P.; OLNEY, J. W.; SHERMAN, W. R. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science*, v. 220, p. 323-325, 1983.

HOOD, S.; AMIR S. Neurodegeneration and the circadian clock. *Front Aging Neuroscience*, v. 9, p. 170. 2017.

HOSFSTRA, W. A.; DE WEERD, A. W. The circadian rhythm and its interaction with human epilepsy: a review of literature. *Sleep Medicine Reviews*, v. 13, n. 6, p. 412-20, 2009.

JACOBS, M. P. et al. Curing epilepsy: progress and future directions. *Epilepsy & Behavior: E&B*, v.14, n.3, p.438-45, Mar. 2009

KALEYIAS, J., et al. Sleep-wake patterns of seizures in children with lesional epilepsy. *Pediatric Neurology*, Agos v. 45, n. 2, p. 109-13, 2011.

KENNAWAY, D. J. The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Human Reproduction Update*, v. 11, p. 91-101, 2004

KNUTSON, K. L.; CAUTER, E. V. Associations between Sleep Loss and Increased Risk of Obesity and Diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1129, p. 287-304, 2008.

LEITE, J. P. et al. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neuroscience Biobehav. Rev.*, v.14, n.4, p.511-7, 1990.

LEITE, J.P.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neuroscience. Biobehav. Rev.* v. 14, p. 511-517. 1990.

LI, J. D.; HU, W. P.; ZHOU, Q. Y. Chapter 7 - The circadian output signals from the suprachiasmatic nuclei. *Progress in Brain Research*, v. 199, p. 119-127, 2012.

LOTHMAN, E.W.; BERTRAM, E. H.; STRINGER, J. L. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Progress in Neurobiology*, v. 37, n. 1, p. 1-82, 1991

LOWREY, P. L.; TAKAHASHI, J. S. MAMMALIAN CIRCADIAN BIOLOGY: Elucidating Genome-Wide Levels of Temporal Organization. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 5, p. 407-441, 2004.

MARQUES, T. E. B. S. Efeito de alterações do ritmo circadiano no status epilepticus e epileptogênese. 2018 Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas.

Maceió, 2018.

MARTINS DA SILVA, A. et al. The circadian distribution of interictal epileptiform EEG activity. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 1984.

MATHERN, G. W. et al. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy, *Epilepsy Research*, v. 26, n. 1, p. 151-161, 1996.

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

MATOS, H. 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, p. 632, 2018.

MELDRUM, B. S. Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. *Clinical Science*, v. 68, p. 113-122, 1985.

MIRZOEV, A. et al. Circadian profiles of focal epileptic seizures: A need for reappraisal. *Seizure*. Jul, v. 21, n. 6, p. 412-6, 2012.

MOLINA-CARBALLO, A. Daynight variations in melatonin secretion by the pineal gland during febrile and epileptic convulsions in children. *Psychiatry Research*, v. 52, p. 273-283, 1994.

MORIMOTO, T. et al. Epileptic Seizures Precipitated by Constant Light, Movement in Daily Life, and Hot Water Immersion. *Epilepsia*, v. 26, n. 3, p. 237-242, 1985.

MUSSHOFF, U., et al. Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. *Hippocampus*, v. 12, p. 165-173, 2002.

MURRAY, C. J., et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.

Lancet, dez v. 15, p. 2197-223, 2012.

NZWALO, H. et al. 24-Hour Rhythmicity of Seizures in Refractory Focal Epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, v. 55, p. 75–78, 2016.

OHTA, H.; YAMAZAKI, S.; McMANHO, D. Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*, v. 8, p. 267–269, 2005.

PARAYIOTOPOULO C. P, OBEID T, TAHAN A.R. Juvenile myoclonic epilepsy: a 5-year prospective study. *Epilepsia* v. 35(2), p. 285–96. 1994.

PATKE, A. et al. Mutation of the human circadian clock gene CRY1 in familial delayed sleep phase disorder. *Cell*. v.169(2), p.203-215 2017.

PEREIRA, D. S.; TUFIK, S.; PEDRAZZOLI, M. Timekeeping molecules: implications for circadian phenotypes. *Revista Brasileira Psiquiatria*, v. 31, n. 1, p. 63-71, 2009.

QUIGG, M. Circadian rhythms: interactions with seizures and epilepsy. *Epilepsy Research*, v. 42, p. 43-55, 2000.

REDDY, D. S.; KURUBA, R. Experimental Models of Status Epilepticus and Neuronal Injury for Evaluation of Therapeutic Interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 9, p. 18284-18318, 2013.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology*, v. 63, p. 647-76, 2001.

RICHTER, H. G. et al. The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. *Biological Research.*, v. 37, p. 11-28, 2004.

ROCHA, A. E. L., et al. Pilocarpine-induced epilepsy alters the expression and daily variation of the nuclear receptor ROR α in the hippocampus of rats. *Epilepsy Behav*, v. 55, p. 38-46, 2016

ROENNERBERG, T., et al. Social Jetlag and Obesity. *Current Biology*, v. 22, p. 939-943, 2012.

SANTOS, E. A. S. Expressão Diferencial de Genes Circadianos em Ratos Wistar e em Modelo Experimental de Epilepsia do Lobo Temporal. 2015 Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

SCHEER, F. A. J. L., et al. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 11, p. 4453-4458, 2009.

SCHEFFER I. E. et al. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A distinctive clinical disorder. *Brain*, v. 118, p. 61–73, 1995.

SISODIYA, S. Etiology and management of refractory epilepsies. *Nature Clinical Practice Neurology*, v. 3, n. 6, p. 320-30, 2007.

SLOVITER, R.S. Status epilepticus –induced Neuronal Injury and Network Reorganization. *Epilepsia*. v. 40, p. 34-39. 1999.

SOUSA, C. E. C.; CRUZ-MACHADO, S. S; TAMURA, E. K. Os ritmos circadianos e a reprodução em mamíferos. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*. Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 15-20, 2008.

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

STEWART, L. S.; LEUNG, L.S. Temporal lobe seizures alter the amplitude and timing of rat behavioral rhythms. *Eplilepsy e Behavior*, v. 4, p.153-160, 2003.

TAHSILI-FAHADAN et al. Effect of acute and chronic photoperiod modulation on

pentylentetrazole-induced clonic seizure threshold in mice. *Epilepsy Research*, v.82, p. 64-69, 2008.

TANG, F.; HARTZ, A. M. S.; BAUER, B. Drug-resistant epilepsy: Multiple hypotheses, few answers. *Frontiers in Neurology*, v. 6 n. 8, p. 301, 2017.

TANURI, F. C.; THOMAZ, R. B.; TANURI, J. A. Epilepsia do Lobo Temporal com Aura de Prazer: Um Relato de Caso. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 58, n. 1, p. 178-180, 2000.

TATUM, W. O Mesial temporal lobe epilepsy. *J Clin Neurophysiol*, v. 29, n. 5, p. 356-65, 2012.

TCHEKALAROVA, J. et al. A. Diurnal rhythms of spontaneous recurrent seizures and behavioral alterations of Wistar and spontaneously hypertensive rats in the kainate model of epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, Jan, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2010.

TEODOR, T. P. M. D.; OREN, D. A. Circadian Phase Shifting, Alerting, and Antidepressant Effects of Bright Light Treatment. *Clinics in Sports Medicine*, v. 24, p. 381-413, 2005.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural Brain Research*, v.9, n.3, p.315-35, 1983.

VACCAREZZA, M. M.; SILVA, W. H. Dietary therapy is not the best option for refractory nonsurgical epilepsy. *Epilepsia*, v. 56, n. 9, p 1330-4, 2015.

VAN LUIJTELAAR, E. L. J. M.; COENEN, A. M. L. Circadian rhythmicity in absence epilepsy in rats. *Epilepsy Research*, v.2, p.331-336, 1988.

VAN NIEUWENHUYSE, B., et al. The systemic kainic acid rat model of temporal lobe epilepsy: Long-term EEG monitoring. *Brain Research*, Nov v. 19, n. 1627, p. 1-11.2015.

VIDENOVIC, A. et al. The clocks that time us - Circadian rhythms in Nov 19;1627:1-

11. neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, v. 10, n. 12, p. 683–693, 2014.

WANG, L. M. C., et al. Expression of the Circadian Clock Gene *Period2* in the Hippocampus: Possible Implications for Synaptic Plasticity and Learned Behaviour. *ASN Neuro*, Jun v.1, n. 3, 2009.

WEAVER, D. R. *Circadian Clocks: Role in Health and Disease*. [s.l.: s.n.]

8 ANEXO A



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

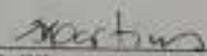


CERTIFICADO

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 Gitai, 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 de Comissão de
Ética no uso de Animais
DIAPE 1120052

Informamos que este trabalho foi submetido para análise nos programas de anti-plágio gratuito: AntiPlagiarist - ACNP Software e Check For plagiarism.