

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

THALITA EWELLYN BATISTA SALES MARQUES

**Efeito da alteração do fotoperíodo na epileptogênese**

Maceió  
2018

THALITA EWELLYN BATISTA SALES MARQUES

**Efeito da alteração do fotoperíodo na epileptogênese**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Neurociências clínica e experimental

Orientador: Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite

Maceió  
2018

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

M357e Marques, Thalita Ewellyn Batista Sales.  
Efeito do fotoperíodo no *status epilepticus* e epileptogênese / Thalita Ewellyn  
Batista Sales Marques. – 2019.  
97 f. : il. color.

Orientador: Daniel Leite Goés Gitai.  
Coorientadora: Ana Catarina Rezende Leite.  
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, 2018.

Bibliografia: f. 84-93.  
Anexos: f. 94-97.

1. Epilepsia do lobo temporal. 2. Epilepsia reflexa fotossensível. 3. Claro  
constante. 4. Escuro constante. 5. *Status epilepticus*. I. Título.

CDU: 616.853



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: [ppgs9@gmail.com](mailto:ppgs9@gmail.com)  
Fone: 82 3254 1850

## Folha de Aprovação

Thalita Ewellyn Batista Sales Marques

Efeito do fotoperíodo no Status Epilepticus e epileptogênese

Tese submetida ao corpo docente do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade  
Federal de Alagoas e aprovada em 14  
de Novembro de 2018.

## Banca Examinadora

Maria Danielma dos Santos Reis  
Prof.ª Dr.ª Maria Danielma dos Santos Reis - (UFAL)

Hugo Juarez Vieira Pereira  
Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira - (UFAL)

Mykaella Andrade de Araújo  
Dr.ª Mykaella Andrade de Araújo - (Examinadora Externa)

## Dedicatória

*Ao meu sobrinho, Gabriel, que me ensina a ver o mundo de uma forma  
tão bonita e instigante quanto a ciência. Te amo.*

## Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter guiado as minhas escolhas que me trouxeram até aqui.

Aos meu pais, Arnon e Emilia, por terem me dado o melhor da vida: amor e educação e incentivo. Obrigada por tudo e por tanto! Amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí por ter sido sempre tão generoso ao compartilhar conhecimento, pelas discussões científicas e contribuição para a minha formação acadêmica. Muito obrigada!

À minha co-orientadora Ana Catarina Rezende Leite, por ter me tirado da minha zona de conforto e me apresentado ao mundo das “mitocas”! Obrigada pelo apoio e por contribuir para a minha formação acadêmica.

Ao meu *supervisor* Dr. Ashok K. Shetty, por me receber em seu laboratório nos EUA para o meu doutorado sanduíche. Obrigada pela oportunidade ímpar e por ter me fascinado ainda mais pela Neurociência.

Aos meus colaboradores e amigos, Heloísa, Wanessa e Reginaldo, por todos os dias, noites e madrugadas de experimentos, pelas discussões científicas, cafés e pasteis juntos. Vocês foram fundamentais para a execução deste projeto.

Às “doutorzinhas”, Bruna, Helô, Myka, Wanessa, e Tay por serem as melhores amigas e colegas de laboratório, com vocês o caminho foi mais leve e feliz. A minha gratidão também as antigas amigas e não menos importantes, Delma e Evelin. Vocês são os melhores presentes que a ciência poderia ter me dado! Amo cada uma de vocês!

À todos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular-UFAL, a minha casa e família científica, vocês todos ocupam um lugar bem lindo na minha memória! Em especial a Carmem, Gabi, Júnior, Pedro, Thay e Ygor, vocês foram essenciais para o bom andamento do meu projeto, obrigada pelo cuidado com meus animais e experimentos.

À todos do LABIO, por serem a minha outra casa na UFAL! Em especial Reginaldo, Ábner e Nerverson por serem excelentes parceiros de laboratório. Todos os experimentos e conversas científicas foram muito valiosos.

À todos os do *Shetty's Laboratory*, por terem me recebido tão bem e por terem sido ótimos colegas de laboratório. Em especial a Sahitti, Bing, Mahedhar, Ragavendra, Eeshika, Andrew e Laila por ter me ensinado tanto durante meu doutorado nos EUA.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde das Universidade Federal de Alagoas.

Aos funcionários do ICBS – UFAL, desde a direção até o pessoal da limpeza, a minha gratidão.

Às instituições FAPEAL e CAPES pelo suporte financeiro. Em especial a CAPES pela oportunidade do Doutorado Sanduíche no Exterior.

À *Texas A&M University*, pela receptividade e por ter me proporcionado experiências inesquecíveis na *aggieland*.

Às minhas irmãs, Camila e Dalila, pelo suporte emocional e financeiro na (difícil) vida de uma estudante de doutorado. Obrigada por existirem e serem melhores irmãs pra mim do que sou pra vocês. A minha gratidão aos meus cunhados Dani e Guga, pelo apoio e por serem como irmãos. Amo vocês!

Ao meu amor e noivo, Igor, por dividir comigo os melhores e piores momentos da vida de pós-graduandos e transforma-los em risadas. Obrigada por ser uma das minhas melhores inspirações, parceiro e incentivador. O mundo é nosso. Te amo!

Aos meus avós Antônio (*in memoriam*), Zefinha, Alfredo e Creuza, tios e primos, obrigada por serem a família mais amorosa e divertida que eu poderia ter, por serem o meu lugar preferido no mundo e fazerem de cada conquista minha um grande evento. A vocês meu eterno amor e gratidão.

À todos os meus amigos, por serem tão bons amigos mesmo eu sendo tão ausente durante todos estes anos e continuarem por torcendo pelo meu sucesso. Amo vocês! Em especial, Amanda, Fernando, Mércia, Day e Maísa.

À Geo, que dividiu a casa e a vida comigo durante boa parte do doutorado. Tenho muito carinho pela amizade que construímos, pelos bons tempos no apêzinho, pelas conversas científicas e políticas, pelos cafés e principalmente pela companhia e cuidado. Você tem um lugar especial na minha história.

À Nancy, por ter sido minha melhor amiga americana no Brasil, pelos cafés e conversas em inglês. Sou grata a Deus por ter te colocado no meu caminho.

Aos amigos que fiz no Texas, vocês me fizeram muito feliz! Não tenham dúvidas que esta experiência de vida compartilhada com vocês estará entre a top 10 da minha vida. Um agradecimento especial a Nara, Jussara, Pedro, Anna, Diane, German e Maria Alejandra vocês fazem parte das melhores memórias dos EUA.

*“Existirmos, a que será que se destina?”*

Caetano Veloso

## Resumo

Há fortes evidências de que as crises epiléticas ocorrem em padrões diurnos de 24 horas. Mudanças no tempo de exposição aos ciclos claro/escuro são capazes de interferir na susceptibilidade das crises epiléticas em modelos animais de epilepsia experimental. A interação entre a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) com o ritmo circadiano é mostrada através da ritmicidade das crises, fase do ciclo em que as crises acontecem e a eficácia de drogas antiepiléticas de acordo com o horário de administração. Entretanto, o conhecimento sobre a relação entre ritmo circadiano e epilepsia ou crises epiléticas é ainda restrito. Neste estudo, nós investigamos o efeito do claro constante e do escuro constante no *Status epilepticus* (SE) e na epileptogênese. Para isto, nós alteramos o ritmo circadiano dos animais, através do claro e do escuro constante e utilizamos o modelo experimental de ELTM induzida por pilocarpina para a indução de SE. Foram utilizados ratos machos *Wistar* divididos nos seguintes grupos experimentais: i) Animais condicionados a 24 horas de claro constante durante duas semanas (grupos CC-CTR, CC-24h e CC-7dias pós SE); ii) Animais condicionados a 24 horas de escuro constante durante duas semanas (grupos EE-CTR e EE-24h); iii) Animais condicionados a 12 horas de claro e 12 horas de escuro durante duas semanas (grupos CE-CTR, CE-24h e CE-7dias pós SE). Foram avaliados: a) a latência para o SE e gravidade das crises epiléticas durante o SE; e b) expressão gênica de genes do relógio molecular circadiano e genes que participam do processo epileptogênico, através da técnica de RT-qPCR; c) ensaio histológico para avaliação da neurodegeneração nos hipocampus dos animais através da técnica de imuno-histoquímica e estereologia; d) atividade de enzimas antioxidantes (SOD, Catalase e GPx); e) quantificação do conteúdo tiol total (SH); f) respiração mitocondrial; e g) potencial elétrico de membrana mitocondrial. Os resultados mostraram que animais condicionados ao claro constante apresentaram um aumento no tempo de latência para o início do SE e tanto os animais do grupo claro constante quanto do escuro constante apresentaram redução da gravidade das crises durante o SE. Além disso, nós observamos mudanças nos níveis de expressão gênica diferencial tanto de genes reguladores do ritmo circadiano (*Clock*, *Bmal*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per3*), quanto de genes que sabidamente fazem parte do processo epileptogênico (*Npy*, *Gad65*, *Gad67*, *TNFA* e *Gfap*). Além disso, a neurodegeneração típica do SE foi reduzida nos animais mantidos sob claro constante. Quanto às análises da atividade de enzimas antioxidantes, nós vimos que a atividade da SOD está aumentada em hipocampo de animais mantidos em claro-claro e escuro-escuro 24h após o SE. Entretanto, há também uma diminuição dos níveis de grupos tióis (SH), ou seja, aumento de tióis oxidados e produção de ERO nos grupos CC-CTR, CC-24h, EE-CTR e EE-24h em relação ao grupo CE-Naive. Por outro lado, os dados de bioenergética mostram que não há disfunção na respiração mitocondrial. Entretanto, nos animais do grupo CC-24h, há perda de potencial elétrico de membrana mais rápida do que nos animais do grupo CE-24h. Estes resultados mostram que a exposição dos animais ao claro constante e ao escuro constante diminui a gravidade das crises durante SE, altera o padrão de expressão de genes reguladores do relógio molecular endógeno e de genes que participam do processo epileptogênico, ativa parte do sistema antioxidante e não afeta o controle respiratório das mitocôndrias. Em conjunto, estes dados sugerem que alterações no ritmo circadiano minimizam os efeitos do SE e da epileptogênese.

Palavras-chave: Epilepsia do lobo temporal, Claro constante, Escuro constante.

## Abstract

There is strong evidence that epileptic seizures occur in diurnal patterns of 24 hours. Changes in exposure time to light/dark cycles are likely to interfere with the susceptibility of epileptic seizures in animal models of experimental epilepsy. The interaction between mesial Temporal Lobe Epilepsy (mTLE) and the circadian rhythm is shown through the rhythmicity of the seizures, daytime's effect on seizure onset and the efficacy of antiepileptic drugs. However, knowledge about the relationship between circadian rhythm and epilepsy or epileptic seizures still limited. In this study, we investigated the effect of constant light and constant dark on *status epilepticus* (SE) and epileptogenesis. For this, we alter the circadian rhythm of the animals through the constant light and constant dark and use the experimental model of TLE induced by pilocarpine. Male Wistar rats were assigned to the following experimental groups: i) Animals conditioned at 24 hours of constant light for two weeks; ii) Animals conditioned at 24 hours of constant dark for two weeks; iii) Animals conditioned at 12 hours of light and 12 hours of darkness for two weeks. For each group, we evaluated a) latency for SE and severity of epileptic seizures during SE; and b) gene expression of circadian molecular clock genes and genes that participate in the epileptogenic process by RT-qPCR; c) neurodegeneration of SE in the animals' hippocampus by immunohistochemistry and stereology; d) activity of antioxidant enzymes (SOD, Catalase and GPx); e) the total thiol content (SH); f) mitochondrial respiration; and g) Mitochondrial Membrane Potential. The results showed that animals conditioned to the constant light presented an increase in the latency time for the SE and the animals of the constant light or dark group presented decrease in seizure severity during SE. We observed changes in the levels of gene expression of both circadian rhythm regulating genes (*Clock*, *Bmal*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, and *Per3*) and genes which are known to be part of the epileptogenic process (*Npy*, *Gad65*, *Gad67*, *TNF $\alpha$* , and *Gfap*). The typical neurodegeneration resulting from SE was reduced in animals kept under constant light. By analyzing the activity of antioxidant enzymes, we found that SOD activity increases in the constant light or dark 24h post-SE groups. However, there is a decrease in the levels of thiols (SH), which means an increase of oxidized thiols and ROS production in the light/light and dark/dark groups in comparison to the naïve light/dark group. Conversely, bioenergetic data show that there is no dysfunction in mitochondrial respiration. However, in the animals of the LL-24h group, there is a loss of mitochondrial membrane potential faster than in the animals of the LD-24h group. These results show that the exposure of animals to constant light or dark decreases the severity of seizures during SE and changes the expression pattern of genes regulating the endogenous molecular clock, and genes that participate in the epileptogenic process and the constant light or dark active part of the antioxidant system and does not affect the respiratory control of mitochondria.

Key words: temporal lobe epilepsy, constant light, constant dark.

## Lista de figuras

**Figura 1** – Comparação da anatomia do hipocampo entre espécies.

**Figura 2** – Processo epileptogênico.

**Figura 3** – Organização do sistema circadiano em mamíferos.

**Figura 4** – Alças de retroalimentação que controlam a maquinaria molecular do relógio circadiano em mamíferos.

**Figura 5** - Delineamento experimental.

**Figura 6** - Latência para o *Status Epilepticus*.

**Figura 7** - Gravidade das crises durante o *Status Epilepticus*.

**Figura 8**- Expressão diferencial de genes do relógio.

**Figura 9** - Expressão diferencial relacionados a epileptogênese.

**Figura 10** - Imunomarcagem de NeuN+ em hipocampus de ratos na fase latente da epileptogênese.

**Figura 11** - Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationala peroxidase (GPx).

**Figura 12** - Quantificação do conteúdo tiol total em hipocampo de ratos submetidos ao SE e eutanasiados 24h após o SE.

**Figura 13** - Respiração mitocondrial de cérebro de rato.

**Figura 14** - Efeito da alteração do fotoperíodo no potencial elétrico de membrana mitocondrial.

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1** – Escala comportamental de crises límbicas de Racine.

**Tabela 2** – Sequência dos primers usados para RT-qPCR.

**Tabela 3** – Tempo de latência para o Status Epilepticus.

**Tabela 4** – Expressão gênica diferencial de genes do relógio biológico.

**Tabela 5** – Expressão gênica diferencial de genes associados ao processo epileptogênico.

**Tabela 6** – Respiração mitocondrial em hipocampo de ratos induzidos ao SE.

## Lista de abreviaturas e siglas

**ADP:** Adenosina difosfato

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BDNF:** Brain-derived Neurotrophic Factor

**Bmal:** Brain and muscle Arnt-like protein-1

**CAT:** Catalase

**CCCP:** carbonil cianida m-clorofenilhidrazona

**cDNA:** DNA complementar

**Cry1:** Cryptochrome Circadian Regulator 1

**Cry2:** Cryptochrome Circadian Regulator 2

**CER:** Crises espontâneas e recorrentes

**Clock:** Circadian locomotor output cycle kaput

**DAE:** Drogas antiepilépticas

**EDTA:** Ethylenediamine tetraacetic acid

**EEG:** Eletroencefalografia

**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

**ERO:** Espécie reativa de oxigênio

**Gad65:** Glutamic acid decarboxylase 2

**Gad67:** Glutamate decarboxylase 1

**GFAP:** Glial fibrillary acidic protein

**GPx:** Glutathione peroxidase

**NPY:** Neuropeptide Y

**NSQ:** Núcleo supraquiasmático

**Per1:** Period Circadian Regulator 1

**Per3:** Period Circadian Regulator 3

**Rplp1:** proteína ribossomal, grande, P1

**RT-qPCR:** Quantitative Reverse-Transcription PCR

**SE:** Status epilepticus

**SOD:** superóxido dismutase

**Tnf:** Tumor necrosis factor

**Tubb2a:** Tubulin, beta 2A class IIa

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>16</b>
1.1	Epilepsia.....	17
1.1.1	Epilepsia do Lobo Temporal .....	18
1.1.2	Epileptogênese.....	21
1.1.3	Alterações epileptogênicas .....	22
1.1.4	Modelo experimental de Epilepsia do Lobo Temporal induzida por pilocarpina	25
1.2	Ritmo Circadiano .....	26
1.2.1	Maquinaria molecular do ritmo circadiano .....	28
1.2.2	Ritmo circadiano e a função mitocondrial.....	30
1.2.3	Ritmo circadiano e doenças .....	31
1.2.4	Ritmo circadiano na epilepsia.....	33
<b>2</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>38</b>
3.1	Delineamento experimental.....	39
3.2	Estabelecimento dos grupos experimentais e grupo controle .....	40
3.2.1	Animais.....	40
3.2.2	Grupos experimentais .....	40
3.3	Indução de Status Epilepticus (SE) através de injeção intraperitoneal de pilocarpina	42
3.3.1	Avaliação comportamental do Status Epilepticus .....	42
3.4	Extração de RNA total de hipocampo de rato.....	43
3.5	Experimentos de RT-qPCR.....	44
3.5.1	Síntese de DNA complementar (cDNA) .....	44
3.5.2	Reação de amplificação .....	44
3.6	Perfusão, processamento do tecido e imuno-histoquímica .....	47
3.6.1	Quantificação por estereologia .....	47
3.7	Atividade de enzimas antioxidantes .....	48
3.7.1	Extração de proteínas.....	48
3.7.2	Dosagem de proteínas totais .....	48

3.7.3	Avaliação da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD) .....	49
3.7.4	Avaliação da atividade enzimática da Catalase (CAT) .....	49
3.7.5	Glutationa Peroxidase (GPx) .....	49
3.7.6	Conteúdo de grupos Sulfidrilas .....	50
3.8	Ensaio mitocondriais .....	50
3.8.1	Isolamento de mitocôndrias de cérebro de rato .....	50
3.8.2	Medida do consumo de oxigênio .....	51
3.8.3	Potencial elétrico de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi$ ) .....	52
3.8.4	Análise estatística .....	52
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>53</b>
4.1	Avaliação das crises comportamentais durante o Status Epilepticus .....	54
4.2	Efeito da alteração de fotoperíodo na expressão genica diferencial em hipocampus de ratos 24 horas após o Status Epilepticus .....	57
4.3	Neurodegeneração (NeuN+) .....	63
4.4	Atividade de enzimas antioxidantes .....	65
4.5	Quantificação do conteúdo tiol total .....	67
4.6	Respiração mitocondrial .....	68
4.7	Potencial elétrico de membrana mitocondrial .....	72
<b>5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>82</b>
	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>84</b>
	<b>Anexos .....</b>	<b>97</b>

# **1 Introdução**

## 1.1 Epilepsia

Epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado pela predisposição persistente do cérebro em gerar crises epiléticas, que resultam em prejuízos neurológicos, cognitivos, psicológicos e sociais para o indivíduo (FISHER et al., 2014). As crises epiléticas são mudanças comportamentais transitórias de sinais e/ou sintomas resultante da atividade neuronal anormal excessiva ou sincrônica de uma ou várias áreas do cérebro (FISHER et al., 2005).

Segundo a Liga Internacional Contra a Epilepsia (*International League Against Epilepsy-ILAE*), quando a atividade neuronal anormal se inicia em uma ou mais regiões específicas do cérebro, as crises são chamadas de crises focais, enquanto que nas crises generalizadas a atividade neuronal anormal começa em ampla distribuição em ambos os hemisférios cerebrais. Existem ainda as 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 (DEVINSKY et al., 2018). Em muitos casos, a causa da epilepsia é desconhecida, em outros, as crises podem ser o resultado de quaisquer insultos que perturbem a função cerebral normal, como por exemplo, acidente vascular cerebral, lesões cerebrais pós-traumáticas, doenças infecciosas como a neurocisticercose, doenças autoimunes e mutações genéticas (SCHEFFER et al., 2017). A identificação de mais de 500 genes associados à epilepsia, sugere que o fator genético é importante para o surgimento das crises e estabelecimento da epilepsia (DEVINSKY et al., 2018).

A epilepsia é considerada uma condição neurológica grave que afeta 65 milhões de pessoas, e é o terceiro principal contribuinte para o número total de distúrbios neurológicos do mundo (GBD 2015 DISEASE AND INJURY INCIDENCE AND PREVALENCE COLLABORATORS, 2016), além de estar associada ao estigma social, comorbidade psiquiátrica e altos custos econômicos (NGUGI et al., 2010). De acordo com estudos de meta-análise, a prevalência é de 6,4 casos de epilepsia por 1.000 pessoas e a incidência anual é de 67,8 casos por 100.000 pessoas/ano. Tanto a prevalência como a incidência são maiores em países de média e baixa renda. Parte destes números pode ser resultado da alta frequência de acidentes de trânsito, traumas de nascimento e neuroinfecções (como neurocisticercose), que podem causar epilepsia (FIEST et al., 2017).

O diagnóstico clínico é realizado de acordo com a classificação da ILAE (FISHER et al., 2017; SCHEFFER et al., 2017), e é baseado em um conjunto de evidências clínicas e epidemiológicas como: tipo crise epilética, frequência e localização do início das crises. O diagnóstico conta com dados de imagem e eletroencefalograma, além de levar em consideração

as comorbidades, como dificuldades de aprendizagem e distúrbios psiquiátricos, incluindo depressão e transtorno do espectro autista (DEVINSKY et al., 2018).

O principal tratamento para controlar as crises epiléticas é o uso de drogas antiepiléticas (DAE), existem mais de 20 diferentes tipos de DAE no mundo. No entanto, aproximadamente um terço dos pacientes não conseguem controlar as crises com o uso da farmacoterapia. A epilepsia é geralmente considerada refratária, fármaco-resistente ou intratável quando as crises não são controladas com o uso de pelo menos duas ou três DAE apropriadas para o tipo particular de epilepsia (TANG; HARTZ; BAUER, 2017).

A epilepsia refratária ou fármaco-resistente está associada ao aumento da morbidade e mortalidade, consequências psicossociais, cognitivas e redução da qualidade de vida do indivíduo. Nesses casos, uma outra opção terapêutica é a cirurgia de epilepsia (SISODIYA, 2007), entretanto, um pequeno número de pacientes é elegível para este tipo de procedimento em que há ressecção da região cerebral com o foco epileptogênico (WIEBE et al., 2001). Existem ainda opções terapêuticas alternativas como a neuroestimulação (LAXER et al., 2014) e dieta cetogênica (VACCAREZZA; SILVA, 2015). Mudanças no estilo de vida dos pacientes também podem ajudar a controlar parcialmente as crises, pois os principais gatilhos convulsivos são a privação de sono, longos períodos de jejum, uso de drogas de abuso como o álcool, nicotina, cafeína, além de estresse psicológico, tensão emocional e input sensorial (por exemplo, fotossensibilidade, luz estroboscópica e jogos de computador).

### 1.1.1 Epilepsia do Lobo Temporal

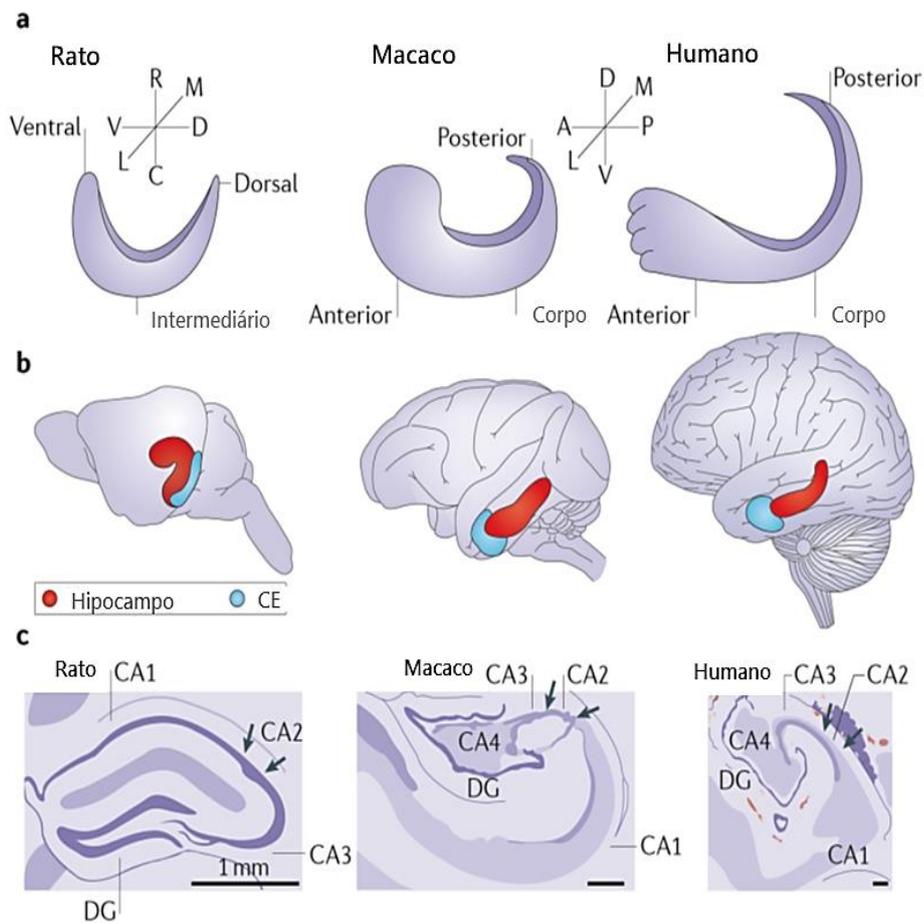
Epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais comum de epilepsia focal, representando a grande maioria das crises parciais (ENGEL, 2001; GASTAUT et al., 1975). Segundo a ILAE, a ELT é classificada como uma condição epilética caracterizada pela presença de crises parciais simples ou complexas, podendo estar associadas a generalizações secundárias. Durante crises parciais simples, há preservação da consciência e os pacientes costumam apresentar manifestações psíquica, gustativa, olfativa e sintomas autonômicos. Em crises parciais complexas, a consciência é prejudicada e, normalmente, os indivíduos apresentam olhar imóvel, acompanhado de automatismos de forma estereotipada, repetitiva e movimentos involuntários (WIEBE et al., 2001).

Aproximadamente 60% dos casos de ELT correspondem à ELTM, sendo a forma mais comum associada à esclerose hipocampal (ELTM-EH). Nos indivíduos com ELTM, a esclerose

hipocampal é a patologia mais comum em pacientes submetidos à cirurgia de epilepsia e tem sido relacionada tanto a causa quanto resultado de crises não controladas. A esclerose hipocampal está presente em 50-70% dos pacientes fármaco-resistentes (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006), para este grupo, a cirurgia de ressecção é uma opção terapêutica. O foco epileptogênico no lobo temporal pode ser identificado através de uma cuidadosa avaliação pré-operatória, com base nas características clínicas e eletrofisiológicas e exames de neuroimagem. Em 60-80% dos casos, as crises cessam após lobectomia temporal (OLBRICH et al., 2002). Entretanto, outros tipos de lesões estruturais, tais como tumores, displasias corticais, hamartomas e malformações vasculares, também são encontrados em pacientes com ELTM (AL SUFIANI e ANG, 2012).

O hipocampo é uma estrutura crítica no processo epileptogênico. Essa região do sistema límbico é composta por duas áreas principais: o corno de Ammon, subdividido em 3 campos numerados de 1 a 3 e abreviados de CA1, CA2 e CA3 e o giro dentado (GD) (Fig. 1). De acordo com o Relatório da ILAE, a esclerose hipocampal é caracterizada histologicamente pela perda neuronal e gliose. Segundo a classificação da ILAE, a EH tipo 1, o tipo mais frequentemente observado de esclerose hipocampal é dividido em dois subgrupos: EH clássica (tipo 1a), caracterizada por uma grave perda neuronal em sub-regiões hipocampais CA1>CA4 e CA3, e danos mais leves em CA2; EH grave (tipo 1b), caracterizada pela perda substancial de neurônios em todos os subsetores hipocampais CA1-CA4. Em ambos subtipos da EH tipo 1 há perda de células granular dentro do DG. A EH tipo 2, ocorre em 5%-10% dos casos de ELT, apresenta perda neuronal grave predominantemente em CA1. A EH tipo 3, observada em 4-7% de todos os casos cirúrgicos de ELT, apresenta uma perda neuronal grave principalmente em CA4 e GD. A classificação inclui um quarto grupo no qual a gliose reativa é vista sem perda neuronal, chamada de “sem esclerose hipocampal, apenas com gliose”. Outros processos biológicos e neuroplásticos também foram descritos no hipocampo de pacientes com ELTM-EH, tais como: a) reorganização axonal, caracterizada pelo brotamento de fibras musgosas na região da camada molecular interna, b) dispersão de células granulares no giro dentado e neurogênese (WIESER e HANE, 2004).

Um dos grandes desafios da epileptologia é entender quais os mecanismos celulares e moleculares que estão envolvidos no processo epileptogênico. Pesquisas nesta área são fundamentais para compreender o estabelecimento da ELT, possibilitar a intervenção precoce e até a prevenção das crises.

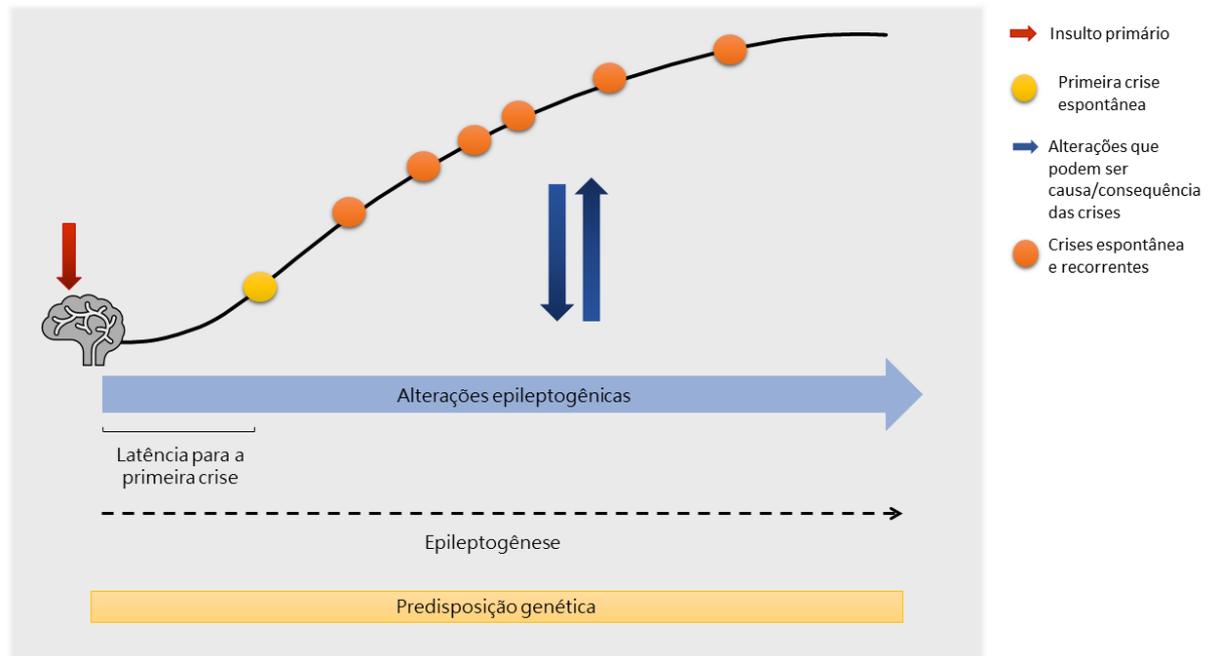


**Figura 1** | Comparação da anatomia do hipocampo entre espécies. a) Orientação do hipocampo de rato, macaco e humanos ao longo dos eixos. Em roedores o eixo longitudinal é descrito como ventrodorsal e como anteroposterior em primatas. b) Hipocampus (vermelho) e córtex entorrinal (azul) em cérebros de ratos, macacos e humanos. c) Ilustração das secções transversais de hipocampus de rato, macaco e humano, marcados por Nissl. A, anterior; C, caudal; CA, Corno de Amon; D, dorsal; DG, giro denteado; L, lateral; M, medial; P, posterior; R, rostral; V ventral (STRANGE et al., 2014).

### 1.1.2 Epileptogênese

A epileptogênese é um processo multifatorial pelo qual a rede neural é alterada funcionalmente resultando na epilepsia. As modificações que ocorrem durante a epileptogênese aumentam a predisposição do cérebro de gerar crises espontâneas e recorrentes (CER), que culminam no estabelecimento e na progressão da epilepsia (DUDEK; STALEY, 2011; PITKÄNEN et al., 2015).

O processo epileptogênico é iniciado por um evento patogênico conhecido por insulto epileptogênico ou insulto primário (e.g. convulsão febril, acidente vascular cerebral, traumatismo cranioencefálico, ou uma alteração genética, e em alguns casos, de origem desconhecida), que culmina nas CERs e progressão da epilepsia. Os mecanismos da epileptogênese incluem alterações estruturais, morfológicas e fisiológicas em neurônios, glia e vasos sanguíneos. Dentre as alterações conhecidas no processo de transição de um “cérebro normal” para um “cérebro epilético” estão, a neurodegeneração, neurogênese, gliose, dano axonal, plasticidade dendrítica, alteração da expressão gênica, neuroinflamação e desregulação da barreira hematoencefálica. Além de outras modificações transcricionais, epigenéticas, e alterações de vias moleculares (DEVINSKY et al., 2018). Esses eventos são responsáveis por gerar um estado de hiperexcitabilidade dos neurônios e hipersincronia das redes neurais que associado a um baixo limiar genético para crises, contribui para o início e progressão da epilepsia (VARVEL; JIANG; DINGLELINE, 2015). Alguns estudos mostram que a frequência e a gravidade das CERs continuam aumentando depois da primeira crise espontânea (BERTRAM; CORNETT, 1994; HELLIER et al., 1998; WILLIAMS et al., 2009; KADAM et al., 2010), sugerindo que a epileptogênese é um processo prologado e contínuo. Em estudos clínicos, foi observado que na epilepsia do lobo temporal, a epileptogênese é progressiva (BERG; ENGEL, 2006; ENGEL, 2008). Neste sentido, a epileptogênese inclui as alterações que ocorrem desde do insulto primário até os mecanismos de progressão que podem continuar a ocorrendo mesmo depois o diagnóstico de epilepsia (PITKÄNEN et al., 2015) (Fig. 2).



**Figura 2** | Processo epileptogênico. A epileptogênese inclui tanto o período de latência entre o insulto primário e a primeira crise espontânea, quanto a progressão da epilepsia. O insulto epileptogênico induz mudanças celulares e moleculares (alterações epileptogênicas) que interferem, direta ou indiretamente, nos circuitos elétricos cerebrais gerando crises epiléticas. As crises recorrentes, por sua vez, provocam alterações celulares e moleculares secundárias, que podem contribuir para a progressão das crises. O curso natural da epileptogênese é diretamente influenciado pela predisposição genética. AUTORA, 2018.

### 1.1.3 Alterações epileptogênicas

As alterações epileptogênicas começam a acontecer antes da primeira crise espontânea e persiste além da primeira crise não provocada. Estas alterações, a frequência e a gravidade das crises espontâneas podem progredir ao longo de várias semanas em modelos animais e por anos em humanos (DUDEK; STALEY, 2011; PITKÄNEN et al., 2015).

Entre as alterações que acontecem na ELTM, está incluso o brotamento de fibras musgosas predominantemente na camada molecular interna e na região hilar hipocampal, podendo estabelecer *feedback* excitatório com o corpo e dendritos de células granulares normais e ectópicas (BUCKMASTER, 2010). O brotamento de fibras musgosas está também relacionado ao início da neurodegeneração de células musgosas excitatórias e perda de interneurônios GABAérgicos e peptidérgicos da região hilar (BUCKMASTER, 2010). Este processo pode acontecer pela super-expressão de neuromodulinas (GAP-43), BDNF, proteínas da matriz extracelular e ativação de mTOR (HECK et al., 2004; HESTER; DANZER, 2014).

Além de que, o brotamento de fibras musgosas está relacionado a neurogênese de células granulares, processo este que é acelerado após o insulto epileptogênico mas é inibido na fase crônica da epilepsia (PARENT; KRON, 2010; RIBAK et al., 2012).

Mudanças fenotípicas nas células gliais estão relacionadas à epileptogênese. O processo de gliose reativa foi observado em tecido cerebral de pacientes que foram submetidos à cirurgia de epilepsia e em modelos experimentais de epilepsia induzida e genética (DEVINSKY et al., 2013). Astrócitos ativados apresentam várias alterações moleculares que podem promover a hiperexcitabilidade de redes neurais, e liberação de gliotransmissores e citocinas que aumentam a sincronização da rede neural (STEINHÄUSER; GRUNNET; CARMIGNOTO, 2015).

A ativação da micróglia é um dos primeiros eventos celulares que ocorrem durante a epileptogênese e é detectado poucos minutos após o início do SE (EYO; MURUGAN; WU, 2017). Esta ativação pode ocorrer por meio de moléculas como o ATP, proteína do grupo de alta mobilidade B1 (HMGB1) e neurotransmissores que são liberados por células funcionalmente viáveis ou danificadas, como neurônios, astrócitos e células do endotélio cerebral, ou ainda pode ser ativada por moléculas circulantes ou trazidas pelos leucócitos através da BHE. A micróglia também pode ativar astrócitos e modular a atividade neuronal na epilepsia (EYO; MURUGAN; WU, 2017). Por ter funções tanto reconstitutivas quanto patogênicas, o bloqueio seletivo de funções microgлияis é fundamental para tentar bloquear a epileptogênese (BENSON; MANZANERO; BORGES, 2015).

Através de métodos que permitem análises de transcriptoma, epigenoma, proteoma, e metaboloma, é possível identificar os mecanismos moleculares da epileptogênese. Descobertas nestas áreas de estudo facilitarão a identificação de novos alvos para terapias anti-epileptogênicas (AEG). Sabe-se que durante a epileptogênese vários genes são diferencialmente expressos (PITKÄNEN et al., 2015; DINGLELINE et al., 2017). Análises de estudos em larga-escala foram capazes de identificar redes de genes e proteínas que são diretamente afetados pelo insulto epileptogênico e pela fase crônica da epilepsia, levantando a hipótese de que alterações nos padrões de expressão podem ser fundamentais para o estabelecimento e progressão da epilepsia (PITKÄNEN et al., 2015). Dentre os genes com papéis importantes no processo epileptogênico estão, o Janus quinase (*Jak*) e transdutores de sinal e ativadores de transcrição (*Stat*), que podem modificar o perfil de expressão de genes envolvidos com o ciclo e sobrevivência celular. Foi visto que a inibição da via JAK-STAT diminui a gravidade das crises epilépticas em ratos (GRABENSTATTER et al., 2014). Um fator de transcrição com papel conhecido é o RE1 que é ativado durante a epileptogênese, afetando a expressão de genes que codificam canais iônicos, receptores e proteínas neuronais. O bloqueio

da transcrição de RE1 diminuiu as alterações epileptogênicas em modelo animal (MCCLELLAND et al., 2014). Durante a epileptogênese ocorre a super-expressão de canais de cálcio tipo T (como Cav3.2) em neurônios piramidais, resultando em crises epiléticas. A deleção de CACNA1H (codificador de Cav3.2) reduz o surgimento de crises espontâneas e diminui os processos neuropatológicos em camundongos submetidos ao SE (VAN LOO et al., 2015). Esses dados sugerem que mudanças no transcriptoma durante o curso da epileptogênese são específicos e dinâmicos.

Mecanismos epigenéticos também afetam a expressão gênica durante a epileptogênese e incluem metilação do DNA, modificação de histonas e expressão de microRNA (miRNA) (HENSHALL; KOBOW, 2015; HENSHALL et al., 2016). Em modelo experimental, a hipometilação de DNA, que permite a ativação gênica, ocorre na fase aguda da epileptogênese, ou seja, logo após o SE. Enquanto a hipermetilação do DNA (silenciamento gênico) ocorre na fase crônica da epilepsia em modelo animal e em indivíduos com ELT (HENSHALL; KOBOW, 2015). Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foram identificados 73 microRNAs diferencialmente expressos na fase aguda da epileptogênese em hipocampus de ratos submetidos ao SE, através da análise em larga-escala utilizando *microarray*. Após a validação de alguns destes microRNAs por RT-qPCR, foram identificados dois novos microRNAs com níveis expressão alterados (196b-5p e 352), e confirmada a sub-expressão do miR-128a-3p, na fase aguda da epileptogênese (DE ARAUJO et al., 2016). Em outro estudo em larga-escala que utilizaram hipocampus de roedores e de pacientes com ELT foi observada a expressão alterada >100 microRNAs que tem como alvo reguladores transcricionais, receptores de neurotransmissores, espinhos dendríticos, sinalização inflamatória, e estão alterados durante a epileptogênese (HENSHALL et al., 2016).

Durante a epileptogênese, várias vias moleculares com funções patogênicas ou homeostáticas são alteradas. O aumento da atividade neuronal ou lesão cerebral ativa respostas imunes inatas do SNC que promovem a produção e liberação de mediadores inflamatórios durante a fase aguda (pós-insulto) e fase crônica da epileptogênese e em alguns modelos de epilepsias genéticas (ARONICA et al., 2017). A neuroinflamação está relacionada ao estresse oxidativo (ROWLEY; PATEL, 2013a). Foi visto que a disfunção mitocondrial gera a produção excessiva espécies reativas de oxigênio (ERO), e induzem atividade de genes pró-inflamatório após o insulto primário e durante as crises, contribuindo para a progressão neuropatologia (ROWLEY; PATEL, 2013a; KOVAC et al., 2014). É provável que os mecanismos que levam ao dano tecidual oxidativo variem nas diferentes fases do processo epilético. Dadas as alterações bioenergéticas que ocorrem durante crises epiléticas e na epileptogênese, o papel

da as mitocôndrias e do estresse oxidativo estão ganhando reconhecimento crescente nos estudos de epileptogênese (LIANG; HO; PATEL, 2000; PATEL; LIANG; ROBERTS, 2001; ROWLEY; PATEL, 2013b). A suscetibilidade do cérebro ao estresse oxidativo e insultos bioenergéticos provavelmente impulsiona ou pelo menos exacerba a excitabilidade neuronal durante a epileptogênese por causa de uma alta demanda metabólica em circuitos hipersincrônicos (ROWLEY; PATEL, 2013a). Tanto a neuroinflamação quanto o estresse oxidativo foram associados à morte neuronal, crises epiléticas, epileptogênese e comorbidades da epilepsia (ARONICA et al., 2017; MAZARATI; LEWIS; PITTMAN, 2017). Terapias anti-inflamatórias ou antioxidantes demonstraram eficácia em estudos preliminares para o tratamento de epilepsia em crianças e adultos fármaco-resistentes (BEN-MENACHEM; KYLLERMAN; MARKLUND, 2000; KENNEY-JUNG et al., 2016). Entretanto, os mecanismos pelos quais a disfunção mitocondrial e geração de EROs contribui para o surgimento, progressão e recorrência das crises espontâneas, ainda precisa ser elucidado.

A epileptogênese, portanto, envolve uma combinação de alterações nas propriedades neuronais que levam ao aumento da transmissão excitatória ou redução da transmissão inibitória. Tais alterações aumentam a uma predisposição do cérebro à atividade anormal e hipersincrônica e, assim, ao desencadeamento de crises epiléticas espontâneas. A maioria dos estudos sobre a fisiopatologia da epilepsia utiliza modelos animais que mimetizam a epilepsia humana e/ou crises epiléticas. Muitos estudos têm focado em investigar a epileptogênese sob o ponto de vista das alterações celulares e moleculares. Entender os mecanismos patogênicos da epileptogênese que culminam no início, recorrência e progressão das crises, é essencial para possibilitar inovações terapêuticas AEG.

#### 1.1.4 Modelo experimental de Epilepsia do Lobo Temporal induzida por pilocarpina

Mecanismos epileptogênicos incluem alterações generalizadas em células neuronais e não-neuronais em vários níveis no cérebro, além de alterações genéticas, epigenéticas e mudanças estruturais que resultam na disfunção de circuitos neuronais. Os modelos experimentais mais utilizados para estudar os mecanismos da epileptogênese mimetizam a condição humana em laboratório. Entre os modelos utilizados estão, neurotrauma, *Status epilepticus*, infecções, hipóxia, isquemia, entre outros (DEVINSKY et al., 2018).

Um dos modelos experimentais de ELT é baseado na administração local ou sistêmica de um potente agonista muscarínico, a pilocarpina (LEITE, J. P. et al., 1990; TURSKI et al., 1983). Segundo HAMILTON et al. (1997), a capacidade da pilocarpina para induzir SE depende da

ativação de um subtipo de receptor muscarínico, o M1. Foi visto que camundongos *knockout* para o receptor *M1* não desenvolvem convulsões em resposta à pilocarpina. Experimentos em cultura de neurônios do hipocampo demonstraram que a pilocarpina, agindo através de receptores muscarínicos, provoca um desequilíbrio entre a transmissão excitatória e inibitória, resultando na geração de SE (PRIEL e ALBUQUERQUE, 2002). A indução de crises por pilocarpina caracteriza-se pela ocorrência de um evento convulsivo inicial que culmina no SE. Durante o SE o animal apresenta crises com diferentes perfis comportamentais, sendo as mais graves, as crises tônico-clônicas generalizadas (CURIA et al., 2008).

O período de até 24 horas após o insulto epileptogênico é conhecido como fase aguda da epileptogênese. Na sequência, o animal apresenta uma fase sem crises conhecido como período de latência que pode durar dias ou meses. Por fim, há o surgimento de crises epiléticas espontâneas e recorrentes, que indicam a fase crônica ou epilepsia (CAVALHEIRO et al., 1991). Neste modelo, o processo epileptogênico correlaciona-se estreitamente com as principais características da ELT, são elas: a) a localização do foco das crises no sistema límbico, especialmente no hipocampo, córtex entorrinal e amígdala (BARTOLOMEI et al., 2005), b) a presença de uma “injúria precipitante”, o SE, que precede o aparecimento da ELT (MATHERN et al., 2002), c) um intervalo de tempo sem crises caracterizado histologicamente pela alta incidência de esclerose hipocampal, perda neuronal, gliose e rearranjos axonais (MATHERN et al., 1997) e, d) as crises recorrentes e espontâneas.

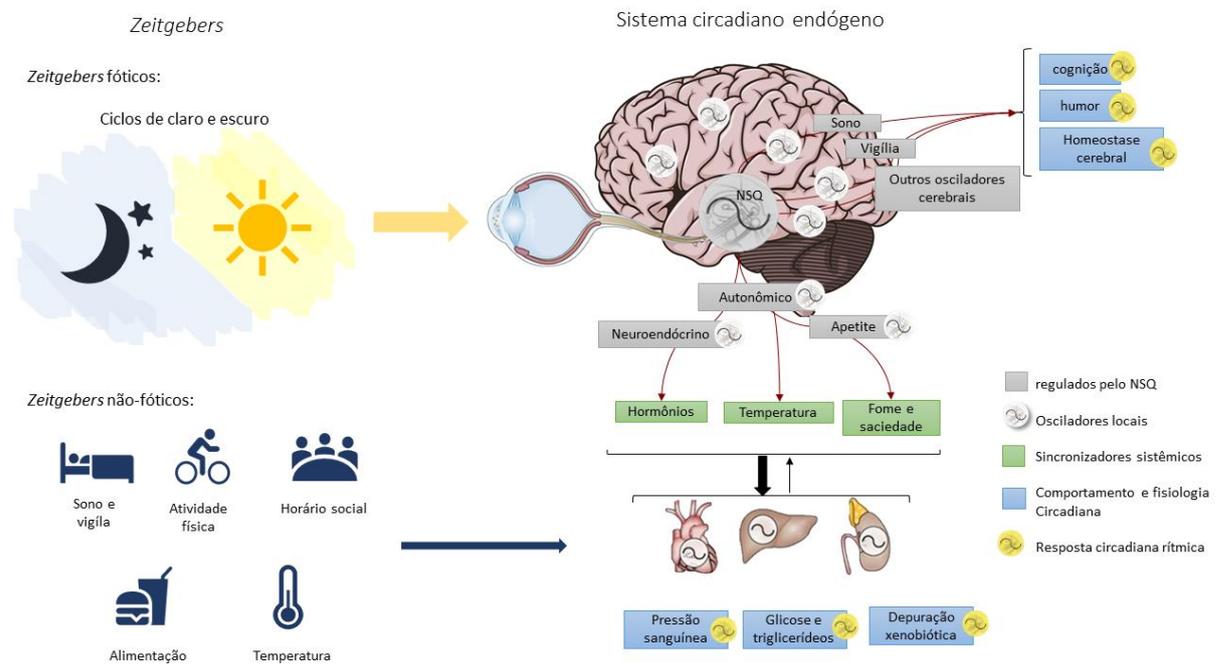
## 1.2 Ritmo Circadiano

Ritmos circadianos são ritmos comportamentais, fisiológicos e moleculares com ciclos de aproximadamente 24h. Esta ritmicidade é gerada por um temporizador biológico endógeno localizado na região hipotalâmica do sistema nervoso central, o núcleo supraquiasmático (NSQ) (WEAVER, 2016a). A primeira observação científica dos ritmos circadianos foi feita em 1729 pelo astrônomo francês Jean Jacques d’Ortois de Mairan que, ao colocar uma planta conhecida como mimosa (*Mimosa pudica*) numa sala em escuro constante, observou que a planta permanecia com sua alternância cíclica diária de movimentos foliares, abrindo pela manhã e fechando à noite (KUHLMAN; CRAIG; DUFFY, 2017). Este experimento forneceu uma visão inicial para relação entre a fisiologia interna dos organismos e o ciclo geofísico. A palavra “circadiano” é derivada do Latim que significa “aproximadamente um dia” (latim: *circa* = cerca; *dien* = dia). Ela foi usada pela primeira vez por Franz Halberg em 1959 para se referir aos ritmos diários e endógenos, ou seja ritmos com duração de 24h que continuam oscilando na

ausência de quaisquer influências ambientais (CHANDRASHEKARAN, 1998). As pistas ambientais de sincronização ou agentes sincronizadores como por exemplo, o ciclo de claro e escuro, são conhecidos como “*Zeitgebers*” (do alemão “doadores de tempo”), sendo a luz o principal sincronizador do NSQ (WEAVER, 2016a).

O relógio molecular localizado em todas as células do corpo é organizado por um sistema hierárquico comandado por um relógio central, o NSQ. O NSQ apresenta uma rede neural circadiana altamente unificada composta por cerca de 10.000 neurônios, que formam um temporizador autônomo capaz de expressar disparos espontâneos de potenciais de ação quando são isolados *in vivo* ou *in vitro* (VIDENOVIC et al., 2014). No entanto, para funcionar efetivamente como um marca-passo central, os neurônios do NSQ recebem *input* de luz diretamente da retina via trato retino-hipotalâmico e sincroniza o relógio biológico interno com dia solar externo (HASTINGS; MAYWOOD; BRANCACCIO, 2018). A partir daí a informação é passada para os sincronizadores periféricos nas células dos tecidos alvo, via sistema neuroendócrino e autônomo, por exemplo. Os temporizadores moleculares localizados em neurônios do NSQ e de todos os tecidos periféricos compartilham da mesma arquitetura da maquinaria molecular, com capacidade gerar e manter o ritmo circadiano. Entretanto uma diferença entre o relógio central e os periféricos é o nível do acoplamento intracelular (LIU et al., 2007). O alto nível de acoplamento intracelular entre os neurônios do NSQ forma uma rede neural resistente a perturbações de fase por sinais internos, enquanto que nos osciladores periféricos as fases são susceptíveis a mudanças por meio de agentes sincronizadores como hormônios circundantes, alimentação e temperatura corporal (PARTCH; GREEN; TAKAHASHI, 2014). Esta rede lógica garante que o temporizador central mantenha um tempo intrínseco de 24 horas, coordenado com o ciclo solar externo, enquanto relógios periféricos estão adaptados para refletir o *status* metabólico do tecido em que eles se localizam (STRATMANN; SCHIBLER, 2006) (Fig. 3).

Uma característica fundamental do ritmo circadiano é sua persistência em condições ambientais constantes tais como claro constante ou escuro constante. Esta capacidade dos relógios de “correr livremente” (do inglês, *free-running*) em condições constantes e em períodos ligeiramente diferentes de 24 horas, mas ainda assim sincronizar, ou “arrastar”, permite que os organismos continuem, pelo menos por um tempo, antecipando mudanças cíclicas do ambiente (VIDENOVIC et al., 2014). Entretanto, quaisquer disfunções desta ritmicidade pode, portanto, afetar negativamente inúmeros processos fisiológicos e comportamentais tais como qualidade do sono, o estado de alerta, desempenho cognitivo, controle motor, o metabolismo e a saúde mental (WEAVER, 2016a).



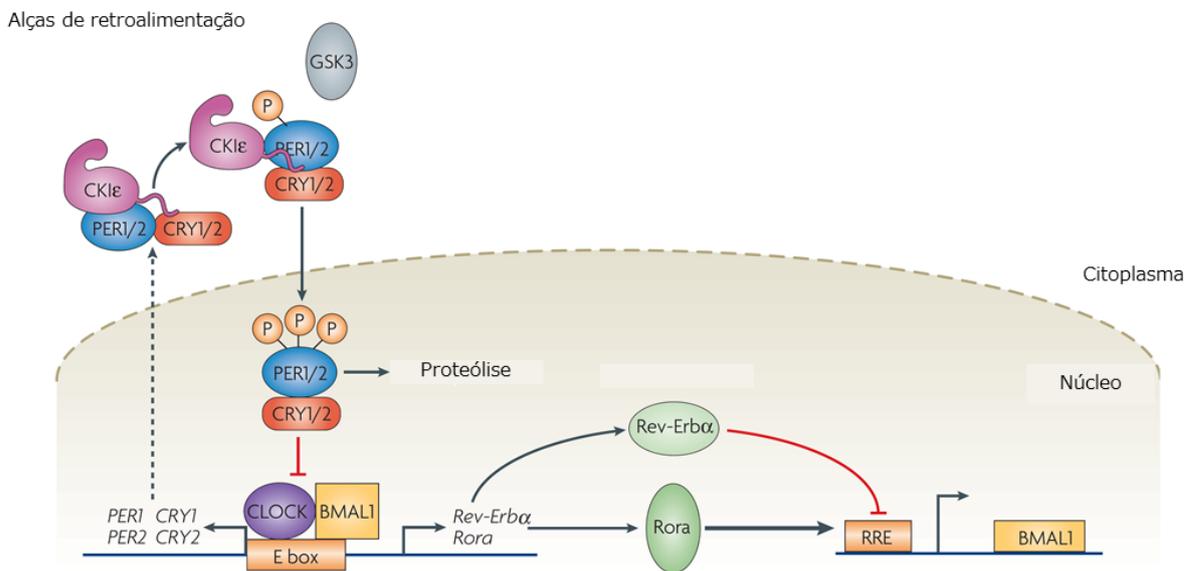
**Figura 3** | Organização do sistema circadiano em mamíferos. O NSQ recebe a informação fóptica diretamente da retina via trato retino-hipotalâmico (TRH), para garantir a sua sincronização aos ciclos de claro e escuro. O NSQ passa a informação circadiana para várias outras regiões cerebrais que contém 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. Autora, 2018.

### 1.2.1 Maquinaria molecular do ritmo circadiano

Hoje sabe-se que o relógio molecular em mamíferos é gerado por duas alças de retroalimentação interligadas que funcionam para produzir um robusto ciclo de expressão gênica de 24h. A alça de retroalimentação negativa é regulada por quatro proteínas integrais, duas ativadoras (CLOCK e BMAL1) e duas repressoras (PER E CRY), bem como cinases (CKI $\alpha$ , CKI $\delta$ , and CKI $\epsilon$ ) e fosfatases (PP1, PP5) que regulam a localização e estabilidade destas proteínas. As proteínas CLOCK E BMAIL1 são elementos membros da família de fatores de transcrição que apresentam o domínio bHLH-PAS (em inglês, *basic helix-loop-helix, Period-ARNT-single-minded*), estas duas proteínas formam um heterodímero (CLOCK:BMAL1) capaz de se ligar a promotores gênicos que contenham uma sequência E-box, ativando a

transcrição dos genes repressores (*Per1*, 2 e 3) e (*Cry1* e 2), bem como outros genes da maquinaria circadiana. A retroalimentação negativa é realizada pelo heterodímero das proteínas PER e CRY que se translocam do citoplasma para o núcleo para inibir uma futura ativação transcricional de CLOCK:BMAL1. As proteínas PER e CRY são degradadas através das vias dependentes da ubiquitina, e quando os níveis destas diminuem, a inibição de CLOCK:BMAL1 é interrompida e o ciclo recomeça. As caseínas quinases CKI $\delta$  e CKI $\epsilon$  desempenham um papel importante na determinação do ritmo circadiano endógeno, elas controlam a entrada no núcleo e a taxa de degradação dos complexos PER: CRY, e sua atividade é neutralizada ou regulada pelas fosfatases PP1 e PP5. O heterodímero de CLOCK:BMAL1 também regula uma segunda alça de retroalimentação positiva que é gerada através da ativação do *Retinoid-related orphan receptors* (RORa, b, c) e repressão de REV-ERB $\alpha$ /REVERB. As proteínas RORa, b, c e REV-ERB $\alpha$ /REVERB competem pela ligação a mesma região, ROREs, presente no promotor de *Bmal1*. O aumento da concentração de BMAL1, promove a inibição da transcrição do próprio gene por meio do aumento dos níveis de REV-ERB, e quando ROR se liga ao promotor, a transcrição de *Bmal1* é ativada podendo formar novamente o fator de transcrição CLOCK:BMAL1, reiniciando um novo ciclo. Estes processos tem uma periodicidade de 24 horas (PARTCH; GREEN; TAKAHASHI, 2014).

Vários estudos em animais demonstraram que mutações ou deleções desses genes acarreta em ritmos com períodos anormais ou mesmo fenótipos arrítmicos quando testados sob condições constantes. Sabe-se que disfunções nos genes do relógio estão relacionadas com o desenvolvimento de várias doenças (HOFSTRA; DE WEERD, 2009)



**Figura 4** | Alças de retroalimentação que controlam a maquinaria molecular do relógio circadiano em mamíferos. Adaptado de (GALLEGO; VIRSHUP, 2007)

### 1.2.2 Ritmo circadiano e a função mitocondrial

As mitocôndrias são organelas celulares com dupla membrana que têm como função predominante a geração de ATP através da fosforilação oxidativa, sendo a fonte primária de compostos energéticos na célula. Além disso, elas desempenham outras funções importantes como a biosíntese de aminoácidos e esteróides, a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, produção e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs), regulação do cálcio intramitocondrial e citoplasmático e transdução de sinais nas vias de sinalização intracelular em algumas formas de apoptose (BRAND; NICHOLLS, 2011).

Evidências recentes indicam que o relógio biológico também regula o funcionamento das mitocôndrias. A biogênese mitocondrial é afetada por muitos fatores internos e fatores ambientais, incluindo exercício, restrição calórica, estresse oxidativo e divisão celular, renovação e diferenciação (JORNAYVAZ; SHULMAN, 2010). Sabendo-se que a demanda energética das células flutua ao longo do dia, é de se esperar que a morfologia e/ou funcionamento e a abundância mitocondrial também varie durante ciclos diários de 24 horas

(DE GOEDE et al., 2018). Recentemente, alguns estudos têm investigado como a biogênese, o conteúdo, a dinâmica ou o funcionamento mitocondrial são regulados pelo relógio circadiano. Os primeiros estudos que observaram uma variação circadiana na função mitocondrial utilizaram tecidos cerebrais. Num estudo realizado por SIMON et al. (2003), foi observado que o consumo de oxigênio mitocondrial de mitocôndrias isoladas do córtex cerebral de ratos foi maior durante fase de repouso dos animais, que ocorre na fase clara, em comparação com a fase de atividade, na fase escura do ciclo. Além disso, os controles respiratórios, uma medida da eficiência da respiração mitocondrial, apresentaram variação diária. Em outro trabalho utilizando cérebro de camundongos, foi observado que mais de 300 genes exibiram expressão rítmica ao longo de 24 horas. Foi visto que vários desses genes codificam componentes da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e apresentam picos de expressão no final da fase clara (PANDA et al., 2002). Estes resultados sugerem influência do relógio molecular sobre os processos de fornecimento de energia em neurônios do SNC, que coincide com o aumento da atividade e demanda metabólica na fase clara (DE GOEDE et al., 2018). Além disso, a produção EROs, que desempenham um papel na sinalização celular, também tem sido associada ao relógio circadiano (ROWLEY; PATEL, 2013b; VIDENOVIC et al., 2014). Estas evidências indicam que há relação entre o ritmo circadiano e a bioenergética mitocondrial. Entretanto, os dados que comprovem o funcionamento desta relação ainda são muito escassos.

### 1.2.3 Ritmo circadiano e doenças

Os ritmos circadianos são fundamentais para vida de todos os seres vivos. De fato, a organização temporal circadiana é essencial para processos fisiológicos e metabólicos vitais para a saúde e bem-estar (WEAVER, 2016). Os relógios circadianos são autônomos, produzindo ritmos de 24 horas, mesmo na ausência dos *zeitgebers*. A capacidade de gerar ritmos diários é uma das qualidades das células. O ritmo circadiano utiliza seus osciladores temporais distribuídos por todo o corpo para ajustá-lo e prepará-lo para diversas funções que estão sob controle circadiano, incluindo sono e vigília, comportamento, secreção hormonal, regulação do ciclo celular e expressão gênica. Quaisquer danos causados na sincronização circadiana podem desencadear processos patológicos. De fato, perturbações do ciclo circadiano no cérebro comprometem a qualidade do sono, cognição, formação de sinapses, além da remoção de metabólitos cerebrais, e estão associadas a doenças neurológicas, psiquiátricas, e metabólicas (WEAVER, 2016). Neste sentido, é preciso compreender o funcionamento de toda a rede circadiana do corpo para poder compreender os mecanismos que ligam a desregulação

circadiana à patologia. A maioria dos estudos utilizam modelos experimentais animais para estudar o impacto da desregulação do ritmo circadiano nas doenças ou vice-versa.

A luz é o principal *Zeitgeber* usado pelo corpo para discriminar dia e noite e regular o ritmo circadiano. Quando a exposição à luz é desequilibrada ou quase constante, os ritmos biológicos podem tornar-se dessincronizados, levando a consequências negativas para a saúde. (BEDROSIAN; NELSON, 2017). A maioria das pessoas está familiarizada com o rompimento de sua fisiologia circadiana que ocorre, por exemplo quando eles fazem viagens transmeridionais, através de vários fusos horários. A ressincronização lenta para o novo fuso horário deixa o indivíduo com perturbação do sono e desconforto gastrointestinal, entre outras consequências (BEDROSIAN; NELSON, 2017). Estudos em roedores sugerem que o *jet lag* é mais do que apenas um inconveniente. Em um trabalho utilizando modelo animal de “*jet lag* crônico”, foi demonstrado que a desregulação do sistema circadiano leva a uma infinidade de patologias, entre elas, déficits de memória e aprendizado que coincidem com a diminuição de proliferação de células hipocâmpais e neurogênese (GIBSON et al., 2010). Os ritmos circadianos em humanos são altamente afetados por perturbações ambientais que geram consequências importantes para a saúde e bem-estar dos indivíduos. Estudos epidemiológicos forneceram as primeiras evidências que sugerem uma conexão entre o relógio circadiano e saúde humana. Estudos em humanos e modelos animais observaram que o *jet lag* social ou trabalho em turnos – onde há exposição à luz artificial durante a noite – aumenta o risco de desenvolver diferentes tipos de câncer, entre eles o câncer de mama e doenças metabólicas crônicas, como diabetes mellitus tipo 2 (HASTINGS; REDDY; MAYWOOD, 2003; WEAVER, 2016).

Em alguns casos, o controle normal da fisiologia circadiana torna-se alterado na doença. Martino e colaboradores descobriram similarmente que o descompasso entre o período exógeno do ciclo do claro e o relógio circadiano endógeno produziram efeitos adversos à saúde, incluindo patologias cardíacas e renais (MARTINO et al., 2008). Por exemplo, em casos de angina pectoris (CANNON et al., 1997), e acidente vascular cerebral (CAsETTA et al., 2002), existe um padrão de pico matinal de acontecimentos associados com alterações circadianas da pressão arterial, débito cardíaco e assim por diante. O risco relativo para o início do infarto agudo do miocárdio é 40% maior no período da manhã, e em relação a outras causas, cerca de 9% de todos os infartos agudo do miocárdio pode ser atribuída a oscilação circadiana (COHEN et al., 1997). Um estudo de meta-análise concluiu que para os casos de morte súbita há um aumento risco de 30% maior pela manhã, e a variação circadiana contribui com cerca de 7% no total de causas (COHEN et al., 1997). A destruição dos núcleos supraquiasmáticos (NSQ), o

marca-passo central dos ritmos circadianos, fez com que os animais perdessem a ritmicidade endógena e preveniu o efeito adverso das alterações do ciclo de claro; indicando que perder a ritmicidade circadiana endógena é menos danoso do que alterações no relógio biológico (TUREK, 2008).

Foi constatado que deferentes alterações circadianas, induzidas em laboratório, aumenta a mortalidade em ratos idosos, prejudica a sobrevivência e a função imune em camundongos, promove o crescimento do tumor, prejudica a reprodução, promove perda de células  $\beta$  pancreáticas, gera resistência à insulina e obesidade, além de promover inflamação intestinal, altera o micro bioma e exacerba derrames intestinais induzidos por álcool e doença hepática (WEAVER, 2016).

As perturbações no ritmo circadiano observadas na doença de Alzheimer (DA) são comparáveis às observadas no envelhecimento normal, entretanto são muito mais pronunciadas e graves. Nestes indivíduos, o sono é muitas vezes altamente fragmentado, com despertares frequentes. Um atraso de fase do período noturno é um indicador típico de distúrbio do ritmo circadiano na DA, e essas alterações aumentam com a duração e a progressão da doença. Alterações nas mudanças periódicas da temperatura corporal central também foram descritas como um indicador de disfunção circadiana na DA (HARPER et al., 2004). Da mesma forma, alterações circadianas e do sono e representam características não-motoras comuns da doença de Parkinson e da doença de Huntington (VIDENOVIC et al., 2014). Estudos clínicos e utilizando modelos experimentais animais para doenças neurodegenerativas revelaram a natureza progressiva da disfunção circadiana ao longo do curso da neurodegeneração e sugerem estratégias para a restauração da ritmicidade circadiana através de cronoterapias e intervenções farmacológicas. No caso da epilepsia, pesquisas mostram que as crises epiléticas ocorrem em padrões diurnos e circadianos, sugerindo que o ritmo circadiano pode ter um papel na epilepsia (TCHEKALAROVA et al., 2010; MIRZOEV et al., 2012; VAN NIEUWENHUYSE et al., 2015; NZWALO et al., 2016).

#### 1.2.4 Ritmo circadiano na epilepsia

Em estudos com humanos e animais com epilepsia foram observados que as crises epiléticas, apesar de serem imprevisíveis, seguem padrões circadianos de ocorrência. Em alguns tipos de epilepsia, estes padrões de distribuição são específicos e não-aleatórios (MARTINS DA SILVA et al., 1984; DURAZZO et al., 2008; HOFSTRA et al., 2011). Estudos recentes observaram que em indivíduos com ELTM o padrão circadiano das crises epiléticas

apresenta distribuição uni ou bimodal (KALEYIAS et al., 2011; MIRZOEV et al., 2012; NZWALO et al., 2016). Da mesma forma, em trabalhos utilizando modelos experimentais de ELTM, os animais exibiram padrões de oscilação circadiana para a ocorrência das CERs (ARIDA et al., 1999; QUIGG et al., 2000; TCHEKALAROVA et al., 2010). Esses dados sugerem que as crises límbicas, características da ELTM, são moduladas por um sistema circadiano regulatório. Foi observado que as crises acontecem predominantemente durante a fase clara do ciclo, tanto em pacientes com ELTM quanto em modelo experimental em roedores. Além do que, a maior prevalência de crises durante o dia independe da diferença entre períodos de sono e vigília de cada espécie. Além da prevalência das crises ser maior durante a fase clara do ciclo, foi observado que nos animais mantidos em escuro constante (livre curso), as CERs continuaram seguindo um padrão circadiano de ocorrência (QUIGG et al., 1998; QUIGG, 2000; TCHEKALAROVA et al., 2010). Esses achados sugerem que as crises límbicas em ratos seguem um padrão circadiano que é mediado endogenamente.

Por outro lado, as crises epiléticas podem alterar os padrões circadianos de diferentes processos fisiológicos e comportamentais. Foi visto que em modelos experimentais de ELTM ocorrem mudanças nos padrões circadianos de atividade locomotora e temperatura corporal algumas semanas após a indução da SE e/ou após o início das crises espontâneas e recorrentes (QUIGG et al., 2000; STEWART; LEUNG, 2003; PITTSCH et al., 2017). Em um trabalho que utilizou dados contínuos de vídeo-EEG hipocampais, coletados 24 horas/7dias de ratos induzido ao SE por pilocarpina mostrou que após o SE o surgimento das CERs induz uma supressão transitória do padrão fisiológico circadiano do EEG, esta supressão está correlacionada com crises menos graves durante este período. Após o restabelecimento do ritmo circadiano, as crises espontâneas generalizadas ocorreram principalmente de forma agrupada em um menor intervalo de tempo. (PITTSCH et al., 2017).

No entanto, há uma variação nos dados da literatura com relação ao padrão diário das crises, e isto pode estar associado a influência dos fatores ambientais (*zeitgebers*) na modulação da ritmicidade circadiana das crises ou das crises epiléticas sobre o ritmo circadiano. De fato, a privação do sono aumenta a ocorrência de descargas epileptiformes interictais, em comparação com EEG basal na ELT (GIORGI et al., 2014). Por outro lado, as crises epiléticas e os processos epileptogênico podem alterar os mecanismos regulados e/ou reguladores do sistema circadiano, como por exemplo a qualidade do sono. As crises recorrentes, o uso de drogas antiepiléticas e a gravidade da epilepsia podem causar uma desorganização do sono noturno nos indivíduos (HOFSTRA; DE WEERD, 2009).

Quanto a influência circadiana no tratamento dos indivíduos com epilepsia, foi visto que diferentes doses de drogas antiepilépticas são mais eficazes quando a ingestão é ajustada aos turnos de dia e noite (YEGNANARAYAN; MAHESH; SANGLE, 2006; GUILHOTO et al., 2011) . Outro estudo baseado em dados biológicos e epidemiológicos sugere que a terapia com luz pode ser um tratamento eficaz para algumas pessoas com epilepsia (BAXENDALE, 2011). Entretanto, estudos de cronoterapia em epilepsia ainda são escassos.

Embora haja diversos trabalhos na literatura que investiguem interação da epilepsia com o ritmo circadiano, existem algumas lacunas consideráveis no entendimento desta interação, especialmente em humanos, onde os dados de ritmicidade das crises tem a interferência direta dos *Zeitgebers*, e por este motivo não é possível observar os padrões circadianos endógenos. Para estudar os padrões endógenos desta interação é necessário a realização de ensaios em condições ambientais constantes. Ensaios como estes são facilmente realizados em indivíduos saudáveis, mas eticamente não é possível realizar estes tipos de experimento em pacientes com epilepsia, pois sabe-se, por exemplo que a privação de sono pode agravar e aumentar o número de crises (KALEYIAS et al., 2011; GIORGI et al., 2014). Neste sentido, torna-se mais fácil e possível explorar ritmos circadianos e a interação com a epilepsia em laboratório utilizando modelos animais. Ensaios mais elaborados com modelos de epilepsia e alteração de ritmos circadianos podem ser realizados através da mudança de fase do ritmo, animais mantidos em livre-curso, ensaios funcionais com animais *knockdown* e *knockout*, danos no NSQ, e utilização de diferentes DAEs em diferentes momentos do ritmo circadiano, para estudar os efeitos na frequência e distribuição temporal das crises.

Investigar e compreender a natureza bidirecional da relação ritmo circadiano e epilepsia pode contribuir para a melhora diagnóstico e a otimização do momento específico do tratamento da epilepsia. Além de possibilitar a capacidade antecipar o surgimento das crises permitindo o desenvolvimento de estratégias de tratamento preventivo.

## **2 Objetivos**

**Objetivo geral:**

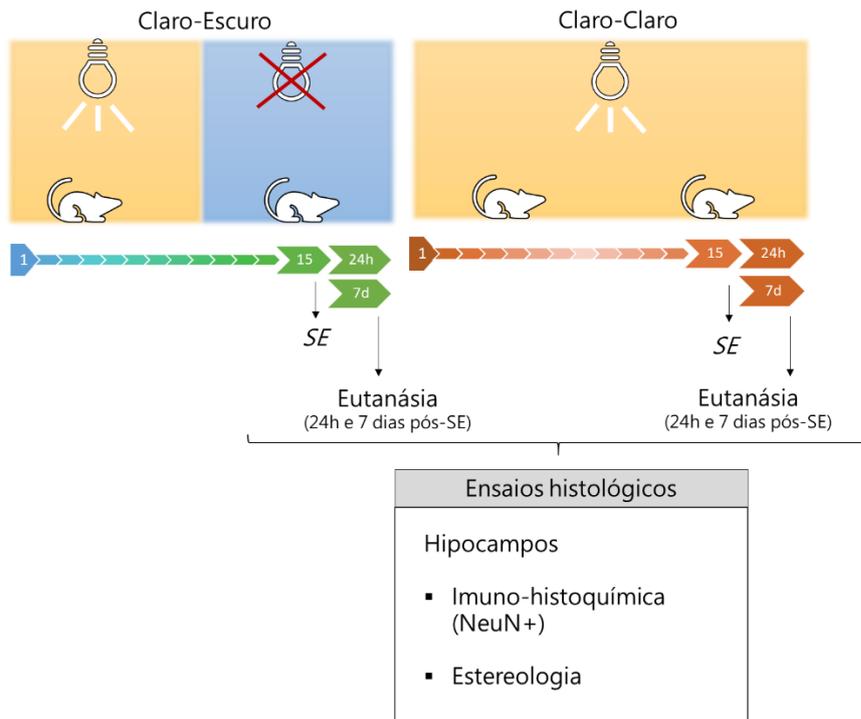
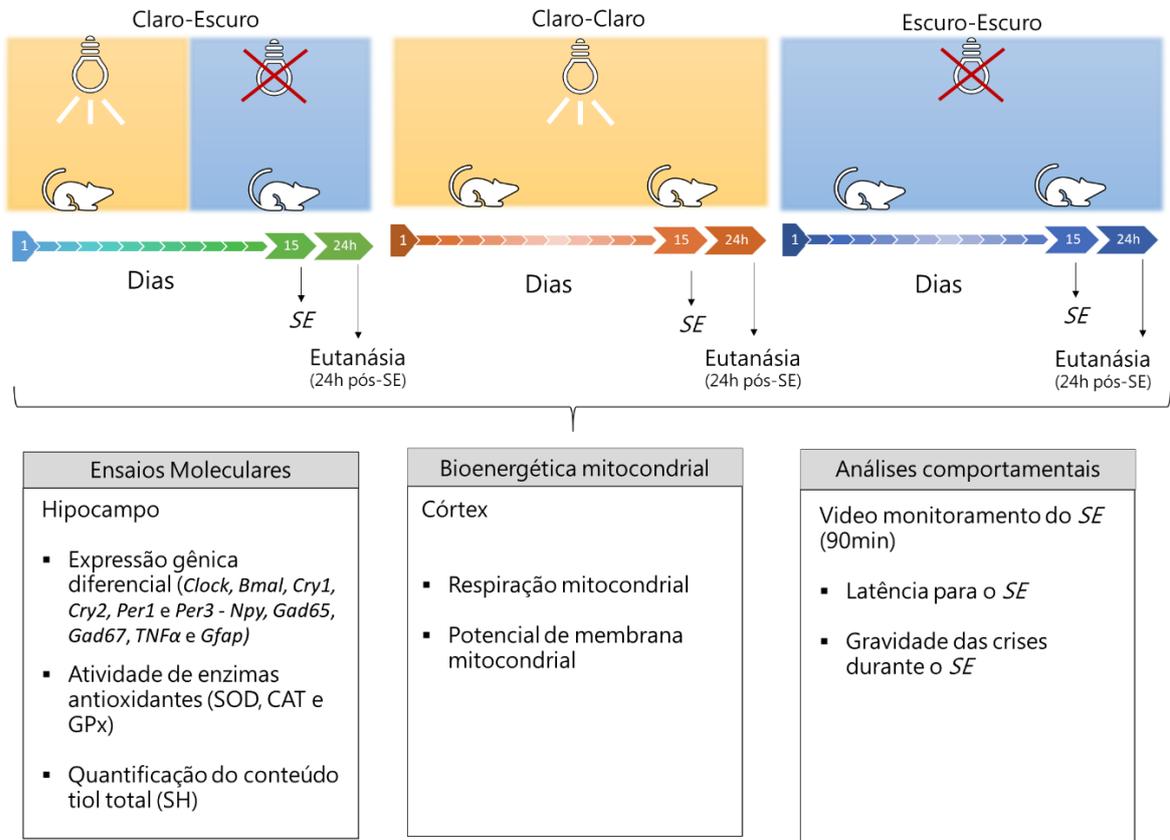
Avaliar o efeito das mudanças de fotoperíodo na epileptogênese.

**Objetivos específicos:**

- Avaliar o efeito do claro constante e do escuro constante na latência e gravidade do *Status epilepticus*.
- Avaliar o efeito do claro constante e do escuro constante na expressão gênica de genes do relógio biológico e genes que fazem parte do processo epileptogênico.
- Mensurar a atividade de enzimas antioxidantes e produção de espécies reativas de oxigênio em hipocampos de animais mantidos em claro constante e escuro constante e submetidos ao *Status epilepticus*.
- Avaliar efeito da alteração do fotoperíodo na bioenergética mitocondrial de mitocôndrias isoladas de cérebro.

### **3 Materiais e métodos**

### 3.1 Delineamento experimental



## 3.2 Estabelecimento dos grupos experimentais e grupo controle

### 3.2.1 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando 90 ratos machos Wistar, oriundos do biotério central da Universidade Federal de Alagoas e 24 ratos machos Wistar da Texas A&M University. 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) e no biotério setorial do Departamento de medicina celular e molecular, 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).

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, processo 62-2014/17-2017 e 2016-0205 D da *Texas A&M University*. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais utilizados nos experimentos e os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações normativas para experimentação animal da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento e *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) da *Texas A&M University*.

### 3.2.2 Grupos experimentais

#### ***Grupo Claro-Escuro (CE)***

Os animais (n= 42) foram mantidos em ciclos normais de 12h de claro e 12h de escuro, as luzes eram acesas às 6h e apagadas às 18h. O Grupo CE-24h é composto por animais eutanasiados 24 horas após SE, o Grupo CE-7d é composto por animais eutanasiados 7 dias após o SE e o Grupo CE-*Naive* é composto por animais não-manipulados. No grupo 1 CE-24h e CE-*Naive* os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados, sendo os hipocampus esquerdos utilizados para as análises de expressão gênica e os hipocampus direitos utilizados para as análises da atividade de enzimas antioxidantes. No grupo 2 CE-24h e CE-*Naive* os

animais foram eutanasiados e o córtex foi imediatamente utilizado para os ensaios de metabolismo mitocondrial. No grupo 3 CE-24h, CE-7d e CE-Naive, os animais foram perfundidos e os cérebros foram coletados para análises histológicas.

### ***Grupo Claro-Claro (CC)***

Os animais (n=42) foram mantidos em 24h de claro constante por duas semanas. O biotério setorial do 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 pudemos comprovar que a sala estava na condição ideal.

O Grupo CC-24h é composto por animais eutanasiados 24 horas após SE, o Grupo CC-7d é composto por animais eutanasiados 7 dias após o SE e o Grupo CC-CTR é composto por animais controle que não foram induzidos ao SE, mas foram mantidos no claro constante. No grupo 1 CC-24h e CC-CTR os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados, sendo os hipocampus esquerdos utilizados para as análises de expressão gênica e os hipocampus direitos utilizados para as análises da atividade de enzimas antioxidantes. No grupo 2 CC-24h e CC-CTR, os animais foram eutanasiados e o córtex foi imediatamente utilizado para os ensaios de metabolismo mitocondrial. No grupo 3 CC-24h, CC-7d e CC-CTR, os animais foram perfundidos e os cérebros foram coletados para análises histológicas.

### ***Grupo Escuro-Escuro (EE)***

Os animais (n=30) foram mantidos em 24h de escuro constante por duas semanas. O biotério setorial do LBCM foi totalmente preparado para alojar os animais na condição de escuro constante. Usamos um luxímetro (Digital lux meter –luxímetro digital MLM – 1011), para verificar a incidência de luz e pudemos comprovar que a sala estava na condição ideal por marcar 0 lux ou escuro total. Para a limpeza e troca das caixas dos animais no biotério, foram utilizadas lâmpadas vermelhas.

O Grupo EE-24h é composto por animais eutanasiados 24 horas após SE e o Grupo EE-CTR é composto por animais controle que não foram induzidos ao SE, mas foram mantidos no escuro constante. No grupo 1 EE-24h e EE-CTR os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados, sendo os hipocampus esquerdos utilizados para as análises de expressão gênica e os hipocampus direitos utilizados para as análises da atividade de enzimas antioxidantes. No

grupo 2 EE-24h e EE-CTR os animais foram eutanasiados e o córtex foi imediatamente utilizado para os ensaios de metabolismo mitocondrial.

### 3.3 Indução de *Status Epilepticus* (SE) através de injeção intraperitoneal de pilocarpina

Para indução do SE, os animais foram submetidos à injeção intraperitoneal (i.p.) de pilocarpina (30mg/kg), em combinação com o lítio (127mg/kg), que aumenta a susceptibilidade de ratos à atividade convulsiva da pilocarpina, resultando em maior porcentagem de ratos que desenvolve SE e baixa taxa de mortalidade. Para diminuir os efeitos periféricos da Pilocarpina foram injetados butilbrometo de escopolamina (1mg/kg, i.p), 30 minutos antes da administração da pilocarpina. Logo após a administração de pilocarpina, os animais foram vídeo-monitorados utilizando-se uma filmadora digital (DCR-SR68, Sony Brasil LTDA). Para a caracterização do início do SE, o critério utilizado foi a ocorrência de crises contínuas que se sustentassem durante o tempo mínimo de cinco minutos após a injeção de Pilocarpina. (LOWENSTEIN e ALLDREDGE, 1998; SHORVON, 1994). Os animais foram mantidos em SE por 90 minutos e após este período os animais receberam Diazepam (5mg/kg) para cessar as crises comportamentais.

#### 3.3.1 Avaliação comportamental 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 1.

**Tabela 1-** 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

(RACINE, 1972)

### 3.4 Extração de RNA total de hipocampo de rato

O RNA total foi isolado utilizando o reagente Trizol de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen, CA, USA), com modificações. Os hipocampos esquerdos dos ratos foram transferidos do *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  para nitrogênio líquido. A cada tubo contendo um hipocampo esquerdo, foram adicionados 350  $\mu\text{L}$  de Trizol, à temperatura ambiente, e os conteúdos foram homogeneizados com pistilos para tubos. Em seguida, foram adicionados 140  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (proporção de 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio para 1mL de Trizol) e os conteúdos foram homogeneizados por inversão e mantidos à temperatura ambiente por cerca de 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas (Heal Force <sup>®</sup> - High speed refrigerated bench) a 12000g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa dos tubos (fase contendo RNA) foi transferida para tubos novos. O restante do conteúdo, interfase e fase orgânica, foi armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Aos tubos contendo as fases aquosas, foram adicionados 175 $\mu\text{L}$  de isopropanol (proporção de 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol para cada 1mL de Trizol). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 12000g por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após essa etapa, o *pellet* de RNA foi visualizado. O isopropanol foi então removido cuidadosamente por inversão dos tubos e foi adicionado 1mL de etanol 75% para lavagem dos *pellets*, que foram deslocados com auxílio do vórtex. Os conteúdos foram novamente centrifugados a 12000g por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi então desprezado, preservando o *pellet*. Os *pellets* foram, em seguida, novamente lavados com 1mL de etanol 75% e centrifugados a 12000g por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após esse processo, os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram mantidos invertidos sobre papel absorvente. Os *pellets* foram

ressuspendidos em 30  $\mu\text{L}$  de água milliq tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente e durante 40 minutos em gelo para completa dissolução dos *pellets*. Após esses procedimentos, as amostras foram armazenadas em *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Todas as soluções foram preparadas com água tratada com DEPC.

A concentração e a pureza dos RNAs foram avaliadas através de espectrofotometria (Espectrofotômetro Eppendorf BioPhotometer Plus). As amostras foram quantificadas a partir da densidade óptica (OD) obtida em comprimento de onda de 260nm. A pureza desses RNAs foi avaliada a partir do cálculo da razão entre os valores de absorbância nos comprimentos de onda 260nm e a 280nm.

### 3.5 Experimentos de RT-qPCR

#### 3.5.1 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com DNase. Aos volumes das amostras correspondentes a 3 $\mu\text{g}$  de RNA total, foram adicionados tampão de DNase 1x (Ambion), 1U de DNase (Ambion) e 2U de *RNaseOUT*<sup>TM</sup> (Invitrogen). As reações foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Foi, então, adicionado EDTA 5 mM e as reações foram incubadas a  $75^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Após o tratamento, todas as amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o *High Capacity*<sup>®</sup> *kit* (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados na reação 2 $\mu\text{L}$  RT Buffer (10x), 0,8 $\mu\text{L}$  de dNTP mix 25x (100Mm), 2 $\mu\text{L}$  de RT Random *Primers* (10x) e 1 $\mu\text{L}$  de MultiScribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (50U/ $\mu\text{L}$ ). A quantidade inicial de RNA utilizada foi de 1 $\mu\text{g}$ . As reações foram incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 min,  $37^{\circ}\text{C}$  por 120 min e  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Após a síntese, foram adicionados 180 $\mu\text{L}$  de água milliq tratada com DEPC. Todas as amostras foram divididas em quatro alíquotas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.5.2 Reação de amplificação

Os ensaios de expressão gênica foram realizados através da metodologia RT-qPCR. As reações foram realizadas utilizando o equipamento *StepOnePlus*<sup>TM</sup> *Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems). As reações de RT-qPCR foram feitas em triplicatas e consistiram em 2,5

$\mu\text{L}$  de cada amostra de cDNA, 6  $\mu\text{L}$  de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Invitrogen), 3  $\mu\text{L}$  de cada *primer* a uma concentração final específica (tabela 6) e 0,5  $\mu\text{L}$  de água, em volume final de 12  $\mu\text{L}$ . As reações de amplificação ocorreram nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O número de ciclos de PCR em que a fluorescência atingiu o limiar (*threshold*) na curva de amplificação – ciclo *threshold* (CT) – foi determinado automaticamente pelo programa *StepOnePlus™* (Applied Biosystems). Os genes analisados foram *Clock*, *Bmal*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, *Per3*, *Npy*, *Tnfa*, *Gad65*, *Gad67* e *Gfap*. Os genes de referências foram *Rplp1* e  *$\beta\text{tub}$*  (Tabela 2).

**Tabela 2-** Sequência dos primers usados para RT-qPCR

Gene	Simbolo	Número de acesso	Sequência dos primers 5'-3'	Amplicon (pb)
Circadian locomotor output cycle kaput	Clock	AB019258.1	F-CTTCAGTTCAGCAGCCAGC R-GCTCTGTTGTAGTGGAAAGGCA	125
Brain and muscle Arnt-like protein-1	Bmal1	NM_024362.2	F-CCGTGGACCAAGGAAGTAGA R-CTGTGAGCTGTGGGAAGGTT	97
Period circadian regulator 1	Per1	NM_001034125.1	F-GCAGAAACAACAGCCACGGT R-GTCCACACAAGCCGTTACATCG	115
Period circadian regulator 3	Per3	NM_023978.2	F-CCACAGCATCAGTACAGCAAG R-GCTCTGTCTCTGTCTATCCT	142
Cryptochrome circadian regulator 1	Cry1	NM_198750.2	F- CAGTTGGGAAGAAGGGATGAAG R-ATGCTCCAGTCGGCGTCAA	60
Cryptochrome circadian regulator 2	Cry2	NM_133405.2	F-ATTGAGCGGATGAAGCAGAT R-CCACAGGGTGACTGAGGTCT	103
Glial fibrillary acidic protein	Gfap	NM_017009.2	F - AACCGCATCACCATTCTGT R - CATCTCCACCGTCTTTACCAC	123
Neuropeptide Y	Npy	NM_012614.2	FGCTCTGCGACACTACATCAATC R-CCATCACCACATGGAAGGGT	147
Tumor necrosis factor	Tnfa	NM_012675.3	F-GCTCCCTCTCATCAGTTCCA R-CTCCGCTTGGTGGTTTGCTA	106
Glutamic acid decarboxylase 2	Gad65	NM_012563.1	F-CAATGTTCCGGCTCTCCTGGT R-CTTGCTCTCCCGTGTCATAGG	120
Glutamate decarboxylase 1	Gad67	NM_017007.1	F-ATCCTAATACTACCAACCTGC R-GCTACGCCACACCAAGTATCA	55
Tubulin, beta 2A class IIa	Tubb2a	NM_001109119.1	F - TTGTGTTCCGGTCAGAGTGGT R - GACTCCTTCCTCACCACATC	103
Ribosomal protein lateral stalk subunit P1	Rplp1	NM_001007604.1	F - GCATCTACTCCGCCCTCA R - ATCTTATCCTCCGTGACCGT	58

### 3.6 Perfusão, processamento do tecido e imuno-histoquímica

Os animais dos grupos CE-Naive, CE-7dias, CC-CTR e CC-7 dias ( $n = 6/\text{grupo}$ ) foram anestesiados através da exposição ao isoflurano e depois perfundidos através do coração usando paraformaldeído a 4%. Em seguida, os cérebros foram cuidadosamente removidos do crânio de cada animal e pós-fixado em paraformaldeído a 4% por aproximadamente 24h horas a 4 °C. Após isso, os tecidos cerebrais foram tratados com solução de sacarose a 30% em PB até afundarem para o fundo do recipiente. Em seguida, os cérebros foram cortados coronalmente através de todo o eixo septo-temporal do hipocampo. Os cortes tinham de 30 micrômetros e foram feitos num criostato, coletado e armazenados em placas de 24 poços contendo tampão fosfato (PB). Para a imuno-histoquímica, foram selecionadas cortes seriais (a cada 20) de todo o hipocampo de cada animal.

A imuno-histoquímica foi realizada para um marcador específico de neurônios maduros, o NeuN. Neste ensaio, as seções foram tratadas pela primeira vez com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 20% de metanol e 3% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos e depois lavados três vezes com PBS. Em seguida, as seções foram tratadas por 30 minutos em PBS contendo 0,1% de Triton X-100 e um soro adequado (10%) selecionado com base nas espécies qual o anticorpo secundário escolhido foi gerado. Os cortes histológicos foram então incubados por 24 horas na solução do anticorpo preparado em PBS. O anticorpo primário utilizado foi um anticorpo monoclonal de rato anti-NeuN (1:1000, Millipore). Após a incubação com o anticorpo primário, as seções foram lavadas três vezes em PBS, incubadas numa solução com o anticorpo secundário durante 60 minutos, e lavadas três vezes em PBS. As seções foram tratadas com reagente complexo de avidina-biotina (ABC, Vector), durante 60 minutos. A reação de peroxidase foi então realizada utilizando 3, 3'-diaminobenzidina (DAB, Vector). As seções foram montadas em lâminas de vidro previamente gelatinizadas. Após a secagem as lâminas foram desidratadas, limpas, e cobertas com lamínulas para serem analisadas por estereologia.

#### 3.6.1 Quantificação por estereologia

A estereologia é uma metodologia de contagem de células que elimina os vieses amostrais. As técnicas estereológicas tem o poder de estimar o número total dos objetos contidos em uma dada região de interesse através da coleta de informação aleatória e sistêmica.

Utilizando essa metodologia, os números estimados a partir da amostragem podem ser expressos em valores relativos ou absolutos indicando volume, número e distribuição espacial das estruturas biológicas. As amostras foram analisadas por estereologia através de uma ferramenta conhecida como fracionador óptico. O fracionador óptico é um dos métodos estereológicos de amostragem sistemática utilizado para estimar o número de células em uma região específica de um órgão, quando a população é demasiada grande para contar exaustivamente. O fracionador óptico utilizado foi o *StereoInvestigator* (Microbrightfield Inc., Williston, VT), que é acoplado a um microscópio Nikon E600 e uma câmera de vídeo (Optronics Inc., Muskogee, OK). Foi quantificado o número de células em cada um dos grupos neuronais imunorreativos para NeuN<sup>+</sup> no hilus do giro denteado, que foram estimadas em 6 secções seriadas.

### 3.7 Atividade de enzimas antioxidantes

#### 3.7.1 Extração de proteínas

Os hipocampus foram macerados e homogeneizado no gelo, em tampão de extração contendo 50mM de Tris-HCl (pH 7,4), 1mM de EDTA e Nonidet<sup>TM</sup> NP-40 (1%), utilizando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. As amostras foram então centrifugadas (HEAL FORCE Neofuge 15R) a 4000 rpm por 10 min/4° C e o sobrenadante coletado para quantificação de proteínas totais.

#### 3.7.2 Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de BRADFORD et al. (1976) em espectrofotômetro (AJX-6100PC). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA (2mg/ml) foi utilizada como padrão.

### 3.7.3 Avaliação da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade de SOD foi feita de acordo com MISRA e FRIDOVICH (1972). Os homogenatos dos hipocampos (100µg de proteína) foram incubados no tampão carbonato de sódio (50 mM, pH 10,2 + 0,1 mM de EDTA) em banho-maria a 30 °C. A reação teve início pela adição de epinefrina (4,5 mM), em ácido acético (0,05%) num volume final de 1 mL. A absorbância foi lida a 480nm por 5 min em espectrofotômetro (AJX-6100PC). Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de proteína requerida para inibir a autoxidação de 1 µmol de epinefrina por minuto. Os resultados foram expressos em U/mg protein.

### 3.7.4 Avaliação da atividade enzimática da Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi monitorada de acordo com AEBI (1984). O princípio do ensaio é baseado na determinação da constante k de decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Foi adicionado 80µg de proteína em tampão fosfato 50 mM (fosfato de sódio monobásico monohidratado + fosfato de sódio dibásico), pH 7,0, 35 °C. Em seguida, a reação foi iniciada com adição de 0,3 M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, num volume final de 1 mL. O decaimento da absorbância foi monitorizado a 240 nm em espectrofotômetro (AJX-6100PC) por 5 min. Uma unidade da CAT foi definida como a quantidade de proteína requerida para converter 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto para H<sub>2</sub>O. A atividade da catalase foi expressa em U/mg de proteína.

### 3.7.5 Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) foi monitorada pela diminuição de absorbância do NADPH a 340 nm em espectrofotômetro (AJX-6100PC), durante 5 minutos, a 25°C, em um meio contendo 100 µg de proteínas, tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0) e 0,005 M de EDTA, 84 µM de NADPH, 1,1 mM de Azida sódica, 1,5 mM de GSH, 0,1 U de Glutathione reductase (GR) e peróxido de hidrogênio 90 µM, num volume final de 1mL (PAGLIA e VALENTINE, 1967). Uma unidade da GPx foi definida como a quantidade de proteína requerida para converter 1 µmol de NADPH por min.

### 3.7.6 Conteúdo de grupos Sulfidrilas

O conteúdo de sulfidrilas foi determinado a partir da reação com o composto DTNB (5,5'-ditiobis (2 ácido nitrobenzólico). Alíquota do homogenato (100 µg de proteína) foi incubada no escuro com 500 µM de DTNB e completado o volume final de 1 mL com tampão de extração. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (UV/VIS Varian) a 412 nm (ELLMAN, 1959). Os resultados foram expressos em mmol/mg de proteína.

## 3.8 Ensaio mitocondriais

### 3.8.1 Isolamento de mitocôndrias de cérebro de rato

As mitocôndrias de cérebro de ratos Wistar foram isoladas pelo método de centrifugação diferencial descrito por Rosenthal et al. (1987) com algumas modificações. Os ratos foram eutanasiados por decapitação, o cérebro foi removido (cerca de 1min e 30 seg), o cerebelo e a medula foram descartados. Após a dissecação os cérebros foram colocados, imediatamente, num recipiente com 10 mL de meio de isolamento, mantido no gelo, contendo 225 mM de manitol, 75 mM de sacarose, 1mM de EGTA, 0,1% de BSA e 10mM de HEPES (pH 7,4), o tecido foi cortado em pequenos pedaços com tesoura e extensivamente lavados com o meio de isolamento, após esta etapa os fragmentos foram homogeneizado manualmente em homogeneizador tipo *Dounce* para provocar a lise celular e obtenção de uma suspensão homogênea. A suspensão foi centrifugada por 3 min a 2.000 g para precipitação de núcleos e resíduos celulares. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi novamente centrifugado por 8 minutos a 12.000 g. O sedimento resultante foi ressuspenso em 20 mL do mesmo meio com adição de 20µL de digitonina 10% e centrifugado durante 10 minutos a 12.000g. O sobrenadante e o pellet mais externo e superior (parte clara) foram descartados e apenas o pellet central (escuro) foi ressuspenso em meio com 225 mM de manitol, 75 mM de sacarose e 5 mM de HEPES (pH 7,2) e novamente centrifugado a 12.000 g por 10 min. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em mesmo meio de reação e mantido em banho de gelo.

Após o isolamento, as concentrações de proteínas das suspensões mitocondriais foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976), descrito no tópico 3.7.2.

### 3.8.2 Medida do consumo de oxigênio

A cinética da fosforilação oxidativa em homogenatos mitocondriais foi elucidada por Chance e Williams em 1955. Os autores demonstraram que o consumo de oxigênio aumentava à medida que substratos e ADP eram adicionados ao homogenato de mitocôndrias, possibilitado a observação de diferentes estados durante a fosforilação oxidativa (CHANCE; WILLIAMS, 1955; MEISTER, 2009). Os estados são:

- Estado 1 – caracterizado pela suspensão mitocondrial no meio de reação;
- Estado 2 – ou estado basal, onde há adição do substrato para cadeia transportadora de elétrons (precursores de NADH, como os intermediários do ciclo de Krebs ou do ácido cítrico; ou piruvato, malato, glutamato,  $\alpha$ -cetogluturato);
- Estado 3 – ou estado  $3_{ADP}$  ou velocidade de fosforilação (V3), caracterizado pelo início da fosforilação decorrente da adição de ADP.
- Estado 4 – ou estado de repouso ou velocidade de repouso (V4), caracterizado pelo esgotamento do ADP. Neste estado, o consumo de oxigênio diminui drasticamente atingindo um platô. O estado de repouso também pode ser induzido pela adição de oligomicina - que é um inibidor exclusivo da ATP-sintase (MURRAY et al. 2014) - nestes casos chamamos estado V4; A adição de oligomicina pode ser seguida pela adição, cuidadosa, de um desacoplador, o CCCP (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona), para a respiração desacoplada ou respiração máxima (estado  $3_{CCCP}$  ou estado  $3_u$ ). O CCCP (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona), é um desacoplador anfipático que aumenta a permeabilidade da membrana interna a prótons, reduzindo o potencial eletroquímico e fazendo com que a respiração ocorra independente da ATP-sintase (MURRAY et al. 2014).

O consumo de  $O_2$  em suspensões de mitocôndrias isoladas foi monitorado utilizando-se um eletrodo tipo OXIGY acoplado ao software OXYGRAPH (Hansateh Instrument, EUA). A concentração de oxigênio inicial no meio de reação é de 225 nmol/ $O_2$ /mL a 28°C (Robinson & Cooper 1970). As suspensões mitocondriais foram adicionadas ao meio de reação contendo 130 mM de KCl, 10 mM de HEPES, 2 mM de  $K_2HPO_4$ , 1 mM de  $MgCl_2$  e 200  $\mu$ M de EGTA e pH 7,2 em uma câmara de acrílico de 1 mL, a 28°C e sob agitação constante, seguida da adição do substrato para o complexo I (5 mM – piruvato/malato/glutamato/ $\alpha$ -cetogluturato 1/2/1/1), 200  $\mu$ M de ADP, oligomicina (1  $\mu$ g/mL) e 1  $\mu$ M de CCCP foram adicionados em sequência em intervalo médio de 5 min entre eles. A qualidade das mitocôndrias foi testada pelo cálculo da

razão entre as velocidades de consumo de oxigênio nos estados de fosforilação oxidativa (V3) e repouso (V4). A suspensão mitocondrial com razão foi superior a 5,0 foi considerada adequada para os ensaios.

### 3.8.3 Potencial elétrico de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi$ )

O  $\Delta\psi$  foi monitorado através da medida pela variação da fluorescência da safranina na suspensão mitocondrial (ÅKERMAN E WIKSTRÖM, 1976), utilizando um espectrofluorímetro. O método consiste no monitoramento das alterações da fluorescência da safranina O. A safranina é um composto catiônico capaz de ser atraído pelo potencial eletroquímico negativo do interior da mitocôndria. Acredita-se que no espaço intramembranar, as altas concentrações de safranina formem múltiplos não fluorescentes. Desta forma, a medida que a mitocôndria perde seu potencial eletroquímico, a interação eletrostática com a safranina diminui e esta é liberada para o meio, resultando no aumento da fluorescência. Sendo assim, a dissipação do potencial de membrana correlaciona-se com o aumento da intensidade de fluorescência do probe (marcador fluorescente) (COLLONA et al. 1973). As mitocôndrias foram incubadas no meio de reação (130 mM de KCl, 10 mM de HEPES, 2 mM de  $K_2HPO_4$ , 1 mM de  $MgCl_2$ , 30  $\mu$ M de EGTA, e pH 7,2) a 28°C, seguido da adição de safranina O a 10  $\mu$ M, substrato para o complexo I (0,34 mM de piruvato, 0,68 mM de malato, 0,34 mM de glutamato e 0,34 mM de  $\alpha$ -cetoglutarato). O desacoplador CCCP (1  $\mu$ M) foi utilizado para despolarizar a membrana mitocondrial interna. A análise foi realizada em espectrofotômetro de fluorescência 5301 (Shimadzu RF. Tóquio, Japão) operando em um comprimento de onda de 495 nm (excitação) e 586 nm (emissão), com aberturas de fendas de 5 nm.

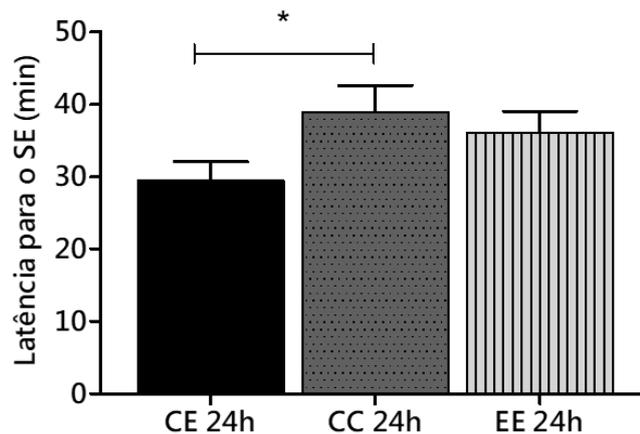
### 3.8.4 Análise estatística

Os dados experimentais foram analisados utilizando-se os softwares GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA) e OriginPro versão 9.0. A média dos valores  $\pm$  erro padrão da média (média  $\pm$  e.p.m) foram submetidos à análise 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. 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.

## **4 Resultados**

#### 4.1 Avaliação das crises comportamentais durante o *Status Epilepticus*

Para a caracterização do início do SE, o critério utilizado foi a ocorrência de pelo menos uma crise de nível  $\geq 3$  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 mostrado na Figura 6 e Tabela 3, o tempo de latência para o início do SE variou significativamente entre os grupos experimentais CE-24h e CC24h. No grupo CE-24h (n=22), a média de tempo para a primeira crise  $\geq$  nível 3 e início do SE foi de  $29.50 \pm 2.552$  min, enquanto que para o grupo CC-24h (n=22), foi de  $38.95 \pm 3.659$  min. Estes resultados mostram que os animais mantidos em claro constante, tiveram um tempo de latência prologado quando comparado ao grupo CE-24h ( $p < 0.05$ ). Entretanto, no grupo EE-24h (n=15) a média de tempo foi de  $36.13 \pm 2.883$  min e sua diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa.



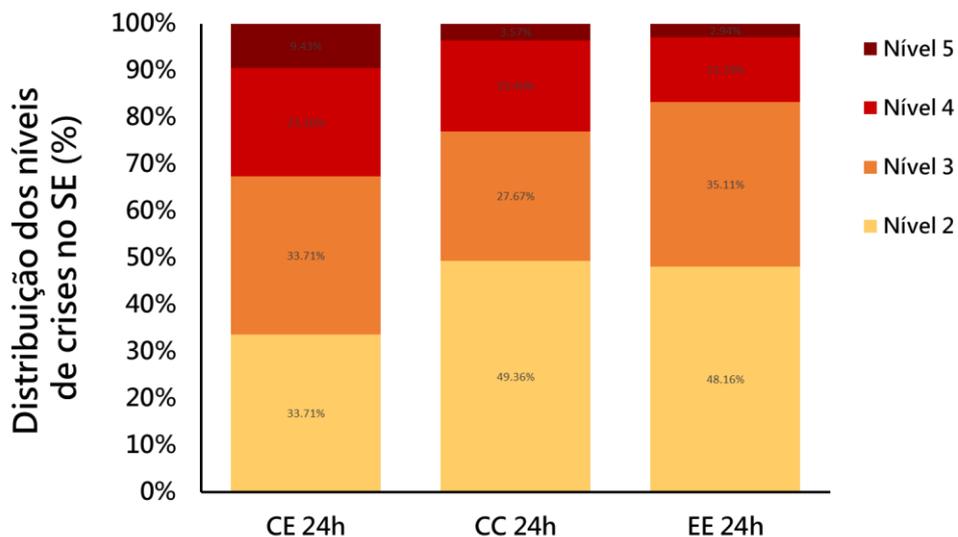
**Figura 6** | Latência para o *Status Epilepticus* em minutos caracterizado pelo início das crises comportamentais. A barra preta representa o grupo de animais que estavam em ciclos de claro-escuro (12h-12h), a barra cinza pontilhada representa o grupo de animais que permaneceram em claro constante e a barra cinza com linhas representa o grupo de animais que estavam em livre curso no escuro constante. Os dados foram expressos em médias + S.E.M, Mann Whitney test (\* =  $P < 0,05$ ).

**Tabela 3** - Tempo de latência para o *Status epilepticus*

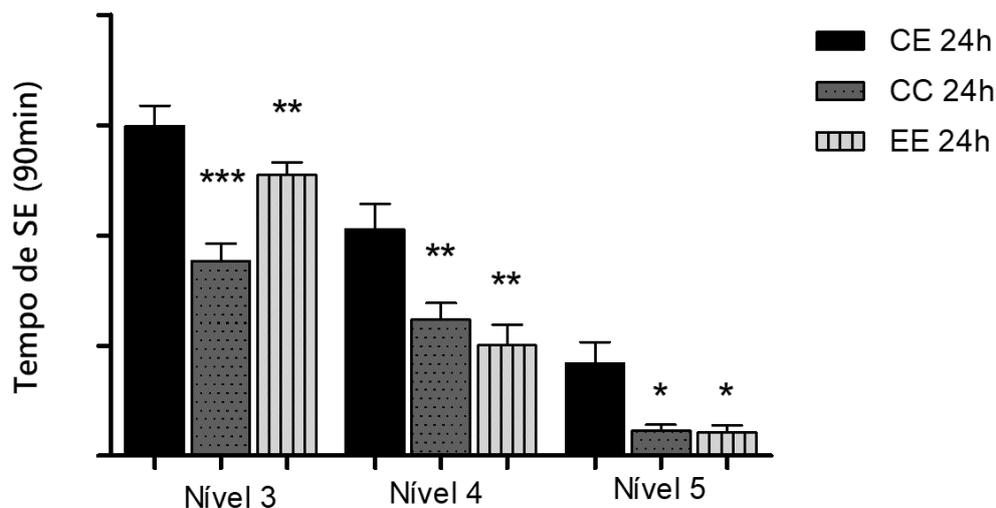
Grupos	Tempo para o SE
CE-24h (N=22)	29.50 ± 2.552
CC-24h (N=22)	38.95 ± 3.659
EE-24h (N=15)	36.13 ± 2.883

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. Os animais do grupo CC-24h e EE-24h tiveram menos crises de níveis 3, 4 e 5 ( $\pm 50\%$ ), comparado com animais os do grupo CE-24h ( $\pm 66\%$ ) (**Fig. 7A**). Conforme mostrado na figura 7B, houve uma diminuição significante nas crises de nível 3, 4 e 5 nos grupos CC-24h e EE-24h quando comparado com grupo CE-24h ( $p < 0,05$ ), houve ainda uma diminuição significante somente nas crises de nível 3 no grupo CC-24h quando comparado com o grupo EE-24h ( $p < 0,05$ ).

A



B



**Figura 7** | Gravidade das crises durante o *Status Epilepticus*. (A) Distribuição dos níveis de crise durante o SE descritos em porcentagem; (B) Comparação dos níveis de crise 3, 4 e 5 entre os grupos experimentais durante o SE. A barra preta representa o grupo de animais que estavam em ciclos de claro-escuro (12h-12h), a barra cinza pontilhada representa o grupo de animais que permaneceram em claro constante e a barra cinza com linhas representa o grupo de animais que estavam em livre curso no escuro constante. Os dados foram expressos em médias + S.E.M, Mann Whitney test (\*\*\*) =  $P < 0,0001$ , \*\* =  $P < 0,01$ , \* =  $P < 0,05$ ).

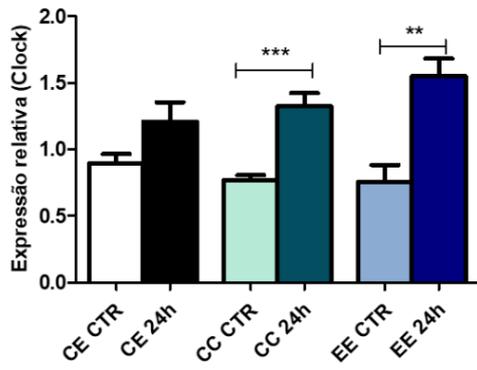
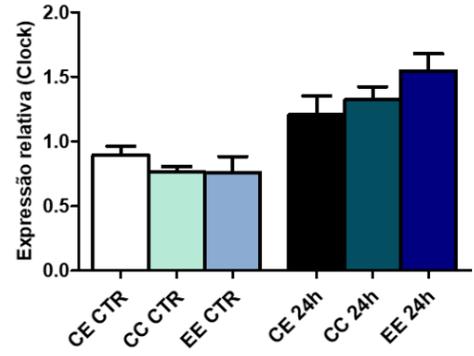
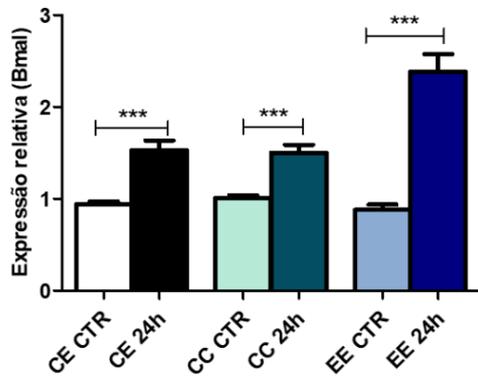
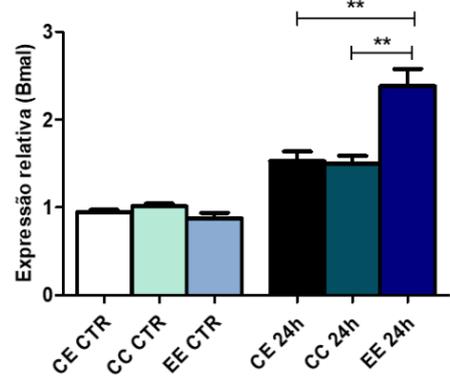
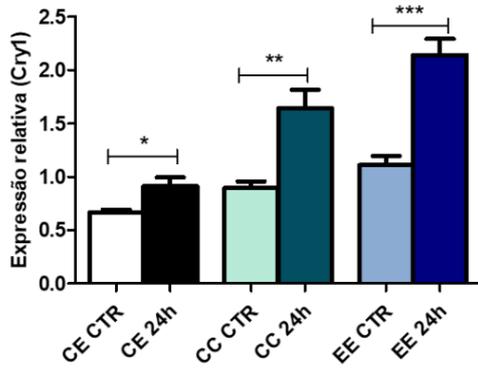
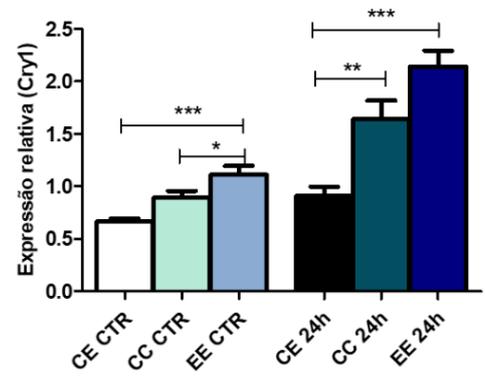
#### 4.2 Efeito da alteração de fotoperíodo na expressão genica diferencial em hipocampus de ratos 24 horas após o *Status Epilepticus*

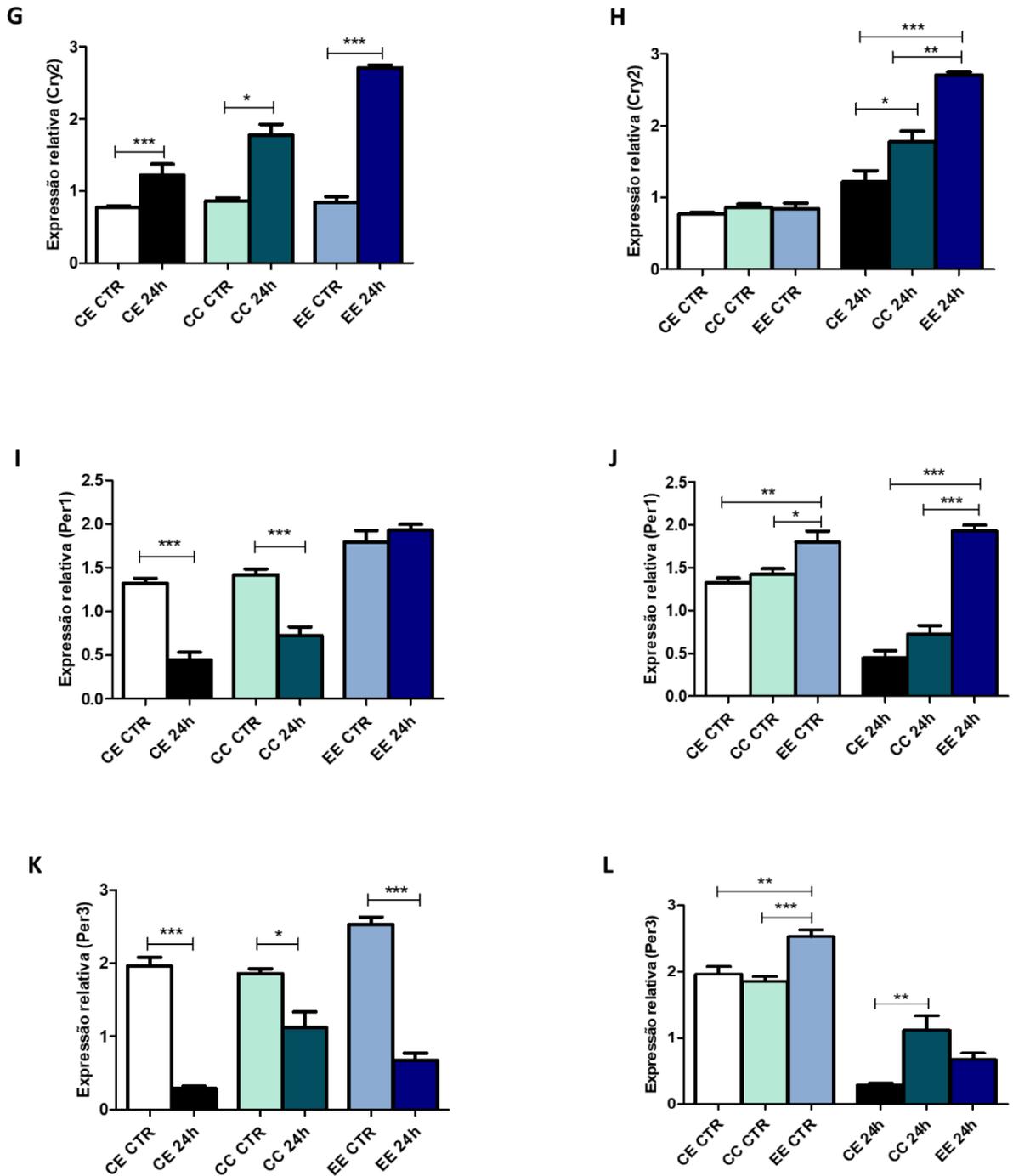
A **Figura 8** e **Tabela 4** mostram os perfis de expressão de genes que fazem parte maquinaria da molecular circadiana, tais como *Clock*, *Bmal*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per3*. Podemos observar que os transcritos de *Clock* apresentam níveis significativamente maiores nos grupos CC-24h comparado com o grupo CC-CTR ( $p=0.0004$ ) e EE-24h comparado com EE-CTR ( $p=0.0016$ ); não houve diferença quando comparamos os grupos CE-24h e CE-CTR (**Fig. 8A**) como também na comparação entre controles (CE-Naive, CC-CTR e EE-CTR) e entre os grupos experimentais (CE-24h, CC-24h e EE-24h) (**Fig. 8B**).

Os níveis de transcritos de *Bmal*, *Cry1* e *Cry2* foram significativamente maiores nos grupos CE-24h, CC-24h e EE-24h quando comparado com seus grupos controle CE-Naive (*Bmal*  $p= 0.0009$ , *Cry1*  $p=0.0201$  e *Cry2*  $p=0.0210$ ), CC-CTR (*Bmal*  $p= 0.0007$ , *Cry1*  $p=0.0019$  e *Cry2*  $p=0.0004$ ), e EE-CTR (*Bmal*  $p= < 0.0001$ , *Cry1*  $p=0.0003$  e *Cry2*  $p=< 0.0001$ ) (**Fig. 8C, E, G, respectivamente**), na comparação entre grupos experimentais os níveis de RNAm de *Bmal* e *Cry1* foi maior no grupo EE-24h em relação aos grupos CE-24h e CC-24h ( $p<0.05$ ) (**Fig. 8D e F, respectivamente**), observou-se ainda um aumento na expressão de *Cry1* no grupo EE-CTR comparado com o grupo CE-Naive e CC-CTR ( $p<0.05$ ) (**Fig. 8D**); a expressão de *Cry2* foi maior no grupo CE-24h comparado com CC-24h, e EE-24h em relação aos grupos CE-24h e CC-24h ( $p<0.05$ ) (**Fig 8H**);

Por outro lado, a expressão relativa de *Per1* é significativamente menor nos grupos CE-24h e CC-24h quando comparado com seus respectivos grupos controle CE-Naive ( $p=<0.0001$ ) e CC-CTR ( $p= 0.0001$ ) (**Fig. 8I**), há um aumento na expressão de *Per1* no grupo EE-CTR em relação ao grupo CE-Naive ( $p<0,05$ ), e do grupo EE-24h comparado com CE-24h e CC-24h ( $p<0,05$ )(**Fig. 8F**).

Enquanto que na **Figura 8L** a expressão relativa de *Per3* é significativamente menor em todos dos grupos experimentais (CE-24h, CC-24h e EE-24h), quando comparado com seus respectivos grupos controle CE-Naive ( $p=<0.0001$ ), CC-CTR ( $p=0.0047$ ) e EE-CTR ( $p=<0.0001$ ) (**Fig. 8K**), entre os grupos experimentais há um aumento nos níveis de *Per3* no grupo EE-CTR quando comparado com CE-Naive e CC-CTR ( $p<0,05$ ), e dos grupos CC-24h e EE-24h comparado ao CE-24h ( $p<0,05$ ) (**Fig. 8L**).

**A****B****C****D****E****F**



**Figura 8** | Expressão diferencial de genes do relógio. Os dados foram expressos em médias + S.E.M. (A) (C) (E) (G) (I) (K) Comparações entre os grupos CE-Naive e CE-24h, CC-CTR e CC-24h, e EE-CTR e EE-24h. Teste t \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , e \*\*\* $p < 0.001$ . (B) (D) (F) (H) (J) (L) Comparações entre grupos controles (CE-Naive, CC-CTR e EE-CTR) e entre os grupos experimentais (CE-24h, CC-24h e EE-24h). One-way ANOVA, seguido do Bonferroni's post hoc. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$

**Tabela 4** - Expressão gênica diferencial de genes do relógio biológico

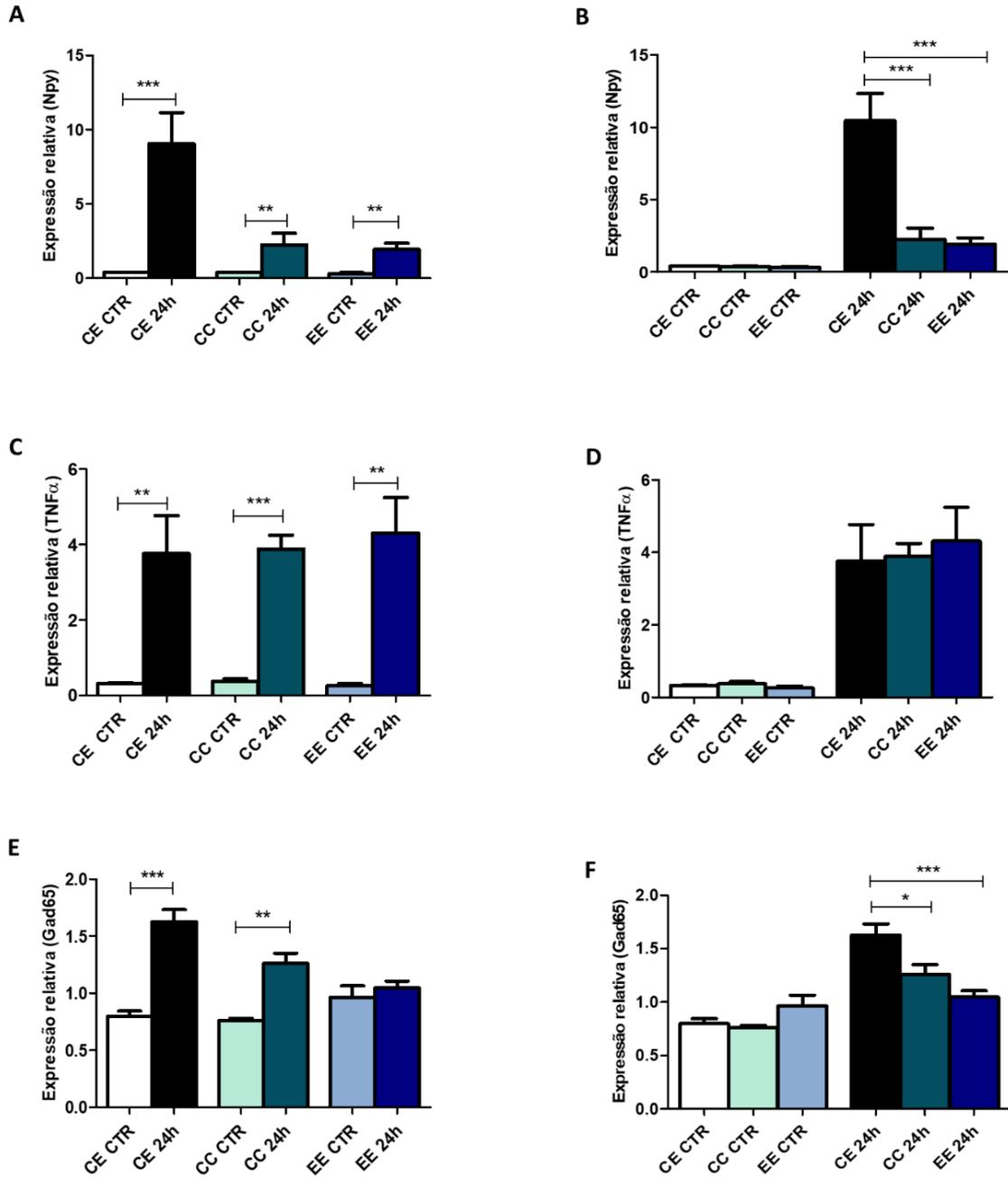
Gene	Claro-Escuro (fase aguda)	Claro-Claro (fase aguda)	Escuro-Escuro (fase aguda)
<b>Clock</b>	—	↑	↑
<b>Bmal</b>	↑	↑	↑
<b>Cry 1</b>	↑	↑	↑
<b>Cry 2</b>	↑	↑	↑
<b>Per 1</b>	↓	↓	↑
<b>Per 3</b>	↓	↓	↓

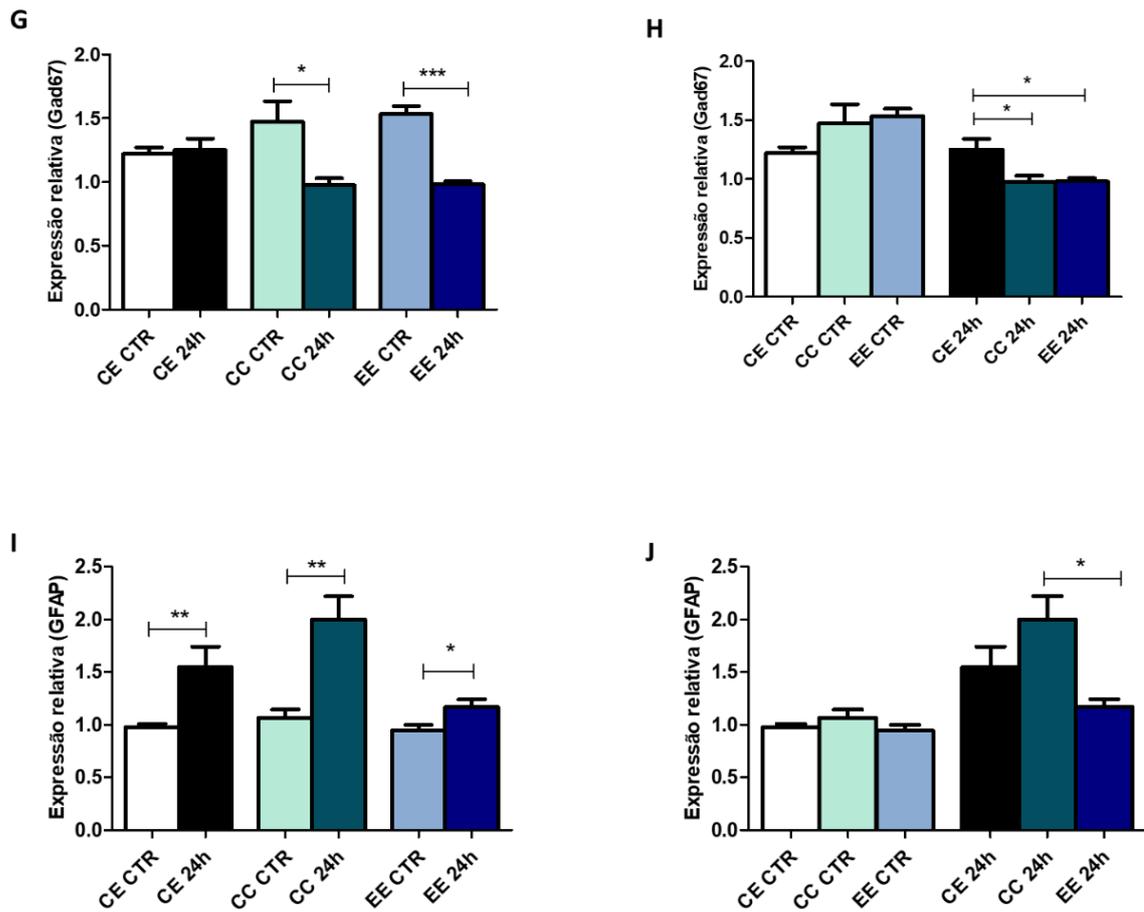
(↑ super-expressão ; ↓ sub-expressão; - não houve diferença de expressão)

A **Figura 9** e **Tabela 5** mostra o perfil de expressão de genes relacionados a processos que ocorrem durante a epileptogênese. A expressão de *Npy* e *Tnfa* é maior nos três grupos experimentais quando comparado com seus grupos controle CE-24h (*Npy*  $p=0.0007$  e *Tnfa*  $p=0.0068$ ), CC-CTR (*Npy*  $p=0.0063$  e *Tnfa*  $p<0.0001$ ) e EE-CTR (*Npy*  $p=0.0041$  e *Tnfa*  $p=0.0015$ ) (**Fig. 9 A e C, respectivamente**). Entretanto, quando a comparação é feita entre os grupos experimentais e entre grupos controle, os níveis de *Npy* é maior apenas quando comparamos CE-24h com CC-24h e EE-24h ( $p<0,05$ ) (**Fig. 9 B**). Não foi observada diferença em *Tnfa* nas comparações entre os grupos experimentais e entre grupos controle (**Fig. 9 D**). Analisando o gene *Gad65* vimos que os níveis de RNAm são maiores nos grupos CE-24h e CC-24h comparado com seus respectivos controles, CE-Naive ( $p=0.0008$ ) e CC-CTR ( $p=0.0055$ ) (**Fig. 9 E**).

Observou-se ainda um aumento de *Gad65* no grupo CE-24h quando comparado com CC-24h e EE-24h ( $p<0,05$ ) (**Fig. 9 F**). Por outro lado, a expressão relativa de *Gad67* é menor nos grupos CC-24h e EE-24h comparado com CC-CTR ( $p=0.0249$ ) e EE-CTR ( $p<0.0001$ ), respectivamente (**Fig. 9 G**). Nas análises entre os grupos controle, foi visto um aumento de EE-CTR com relação ao grupo CE-Naive, e entre os grupos experimentais CE-24h tem níveis de expressão maiores do que CC-24h e EE-24h ( $p<0,05$ ) (**Fig. 9 H**). Enquanto que os níveis de *Gfap* é maior em todos dos grupos experimentais, CE-24h, CC-24h e EE-24h quando comparado com seus respectivos controles, CE-Naive ( $p=0.0080$ ), CC-CTR ( $p=0.0019$ ) e EE-

CTR ( $p=0.0412$ ) (**Fig. 9I**). Entre os grupos experimentais, foi observada o aumento de CC-24h com relação ao grupo EE-24h ( $p<0,05$ ) (**Fig. 9J**).





**Figura 9** | Expressão diferencial relacionados a epileptogênese. Os dados foram expressos em médias + S.E.M. (A) (C) (E) (G) (I) Comparações entre os grupos CE-Naive e CE-24h, CC-CTR e CC-24h, e EE-CTR e EE-24h. Teste t \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , e \*\*\* $p < 0.001$ . (B) (D) (F) (H) (J) Comparações entre grupos controles (CE-Naive, CC-CTR e EE-CTR) e entre os grupos experimentais (CE-24h, CC-24h e EE-24h). One-way ANOVA, seguido do Bonferroni's post hoc. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$

**Tabela 5** - Expressão gênica diferencial de genes associados ao processo epileptogênico

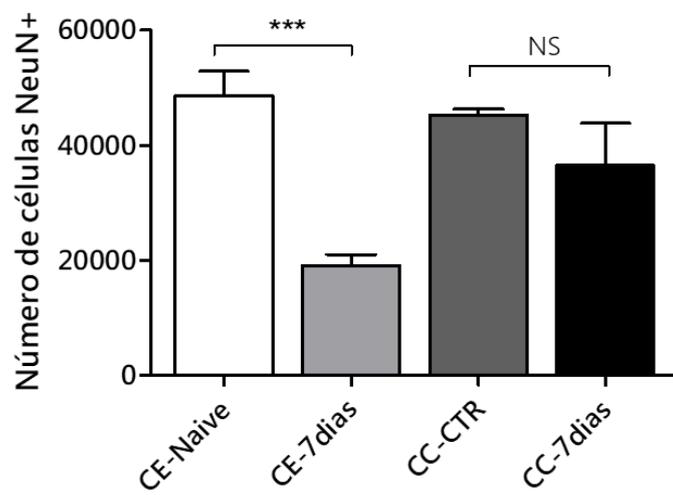
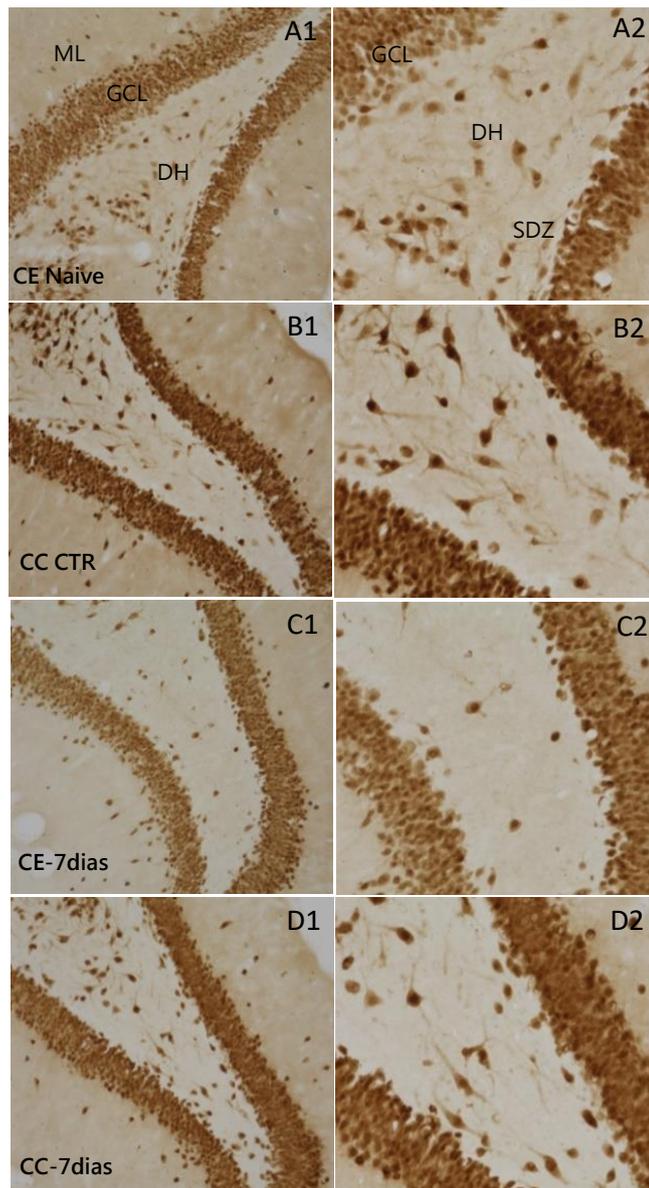
Gene	Claro-Escuro (fase aguda)	Claro-Claro (fase aguda)	Escuro-Escuro (fase aguda)
Npy	↑	↑	↑
TNF $\alpha$	↑	↑	↑
Gad65	↑	↑	—
Gad67	—	↓	↓
Gfap	↑	↑	↑

(↑ super-expressão ; ↓ sub-expressão; - não houve diferença de expressão)

### 4.3 Neurodegeneração (NeuN+)

Imunomarcção (*immunostaining*) de NeuN em hipocampo de ratos submetidos ao SE (**Fig.10**). A densidade total de neurônios nas camadas de células do hilo do giro denteado do hipocampo pareceu claramente reduzida nos animais dos grupos CE-7dias em comparação como o grupo CE-Naive (**Fig. 10 (A1-C1)**). Em contraste, os animais do grupo CC-7dias parecem ter uma densidade de neurônios parecida com a dos animais do grupo CE-Naive e CC-CTR (**Fig. 10 (D1, A1 e B1)**).

A quantificação por estereologia dos neurônios NeuN+ em diferentes camadas celulares do hipocampo confirmou a perda considerável de neurônios em animais CE-7dias quando comparado com CE-Naive ( $p=0.0003$ ) (**Fig. 10 D**). Em contraste, os animais do grupo CC-7dias não exibiram números de neurônios estatisticamente diferentes quando comparados com os de ratos do grupo controle CC-CTR e CE-Naive. Assim, o condicionamento dos animais no claro constante antes e após da indução do SE protegeu notavelmente os neurônios do hilus no hipocampo de sofrerem morte induzida por SE.

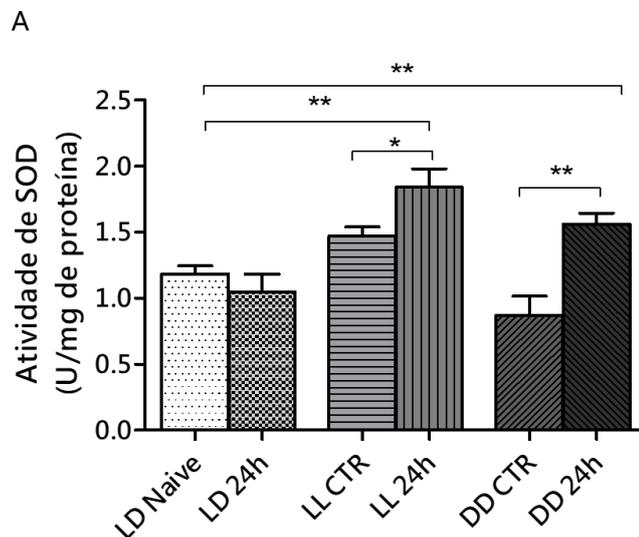


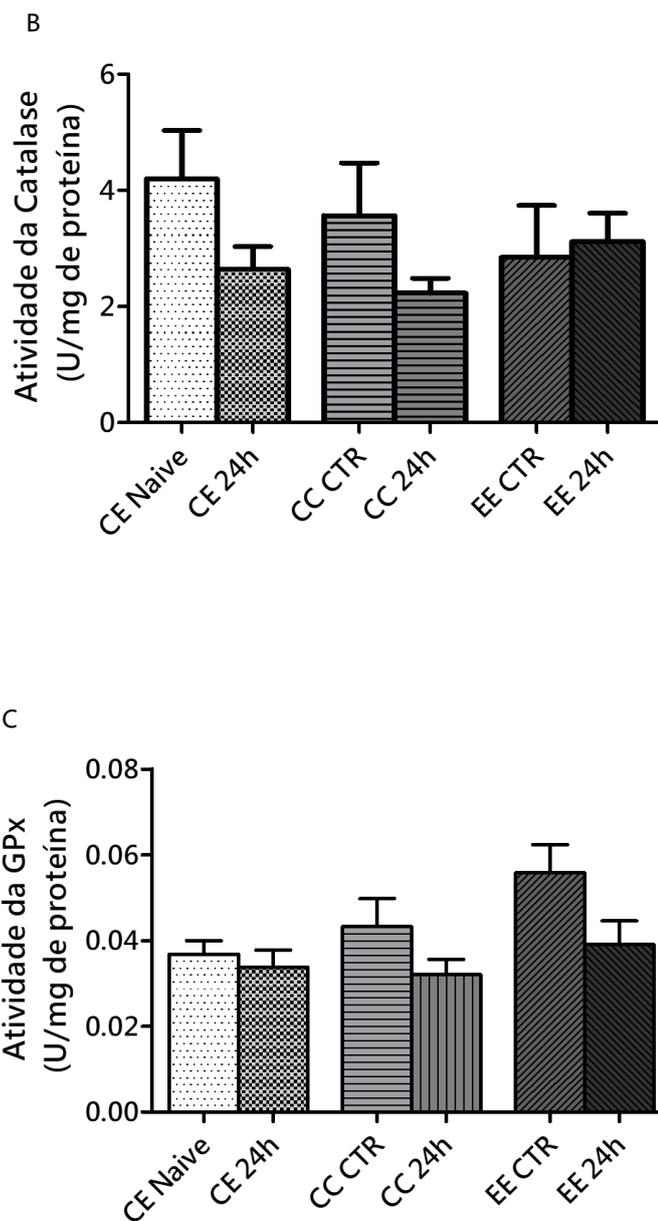
**Figura 10** | Imunomarcção de NeuN+ em hipocampus de ratos na fase latente da epileptogênese. Camadas de células do hilus do giro dentado de hipocampus de ratos mostram a imunomarcção do antígeno nuclear específico para neurônios (NeuN) nos grupos controles CE-Naive e CC-CTR (A1-B1) e grupos experimentais eutanasiados sete dias após o SE, CE-7dias e CC-7dias (C1-D1). As imagens A2, B2, C2 e D2 mostram o hilo do giro dentado de forma ampliada. O gráfico de barras mostra a comparação do número de neurônios NeuN+ em diferentes camadas de células do hipocampo, entre ratos dos grupos controle (CE-Naive e CC-CTR) e ratos dos grupos experimentais (CE-7dias e CC-7dias). Houve uma diminuição significativa em neurônios do grupo experimental CE-7dias quando comparado com o grupo CE-Naive, por outro lado não foi vista uma diferença significativa quando comparamos os grupos de animais mantidos em claro constante CC-CTR e CC-7dias. \*\*\*  $p < 0,001$ ; NS não significativo.

#### 4.4 Atividade de enzimas antioxidantes

Atividade de enzimas antioxidantes em hipocampo de ratos submetidos ao SE. No ensaio para a avaliação da SOD foi observado o aumento da atividade desta enzima no grupo de animais mantidos em claro constante e induzidos ao SE (CC-24h) quando comparado com o seu grupo controle (CC-CTR) ( $p = 0.0387$ ). O aumento na atividade de SOD também foi observado no grupo de animais mantidos em escuro constante e induzidos ao SE (EE-24h) em relação ao seu grupo controle (EE-CTR) ( $p = 0.0034$ ). O perfil de atividade de SOD continuou aumentado quando comparamos o grupo CC-24h com o grupo CE-Naive ( $p = 0.0030$ ) e EE-24h com o grupo CE-Naive ( $p = 0.0072$ ). Não houve diferença quando comparamos os grupos mantidos em ciclos normais de claro/escuro (CE-Naive e CE-24h) (**Fig. 11 A**).

Não foram observadas diferenças significantes na atividade das enzimas catalase e glutathiona peroxidase (**Fig. 11 B-C**)

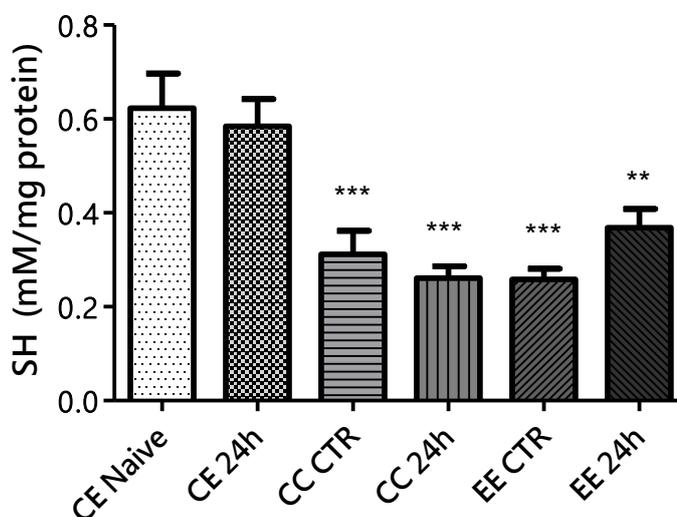




**Figura 11** | Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). A) A atividade de SOD foi maior nos grupos claro constante 24h pós SE (CC-24h) e escuro constante 24h pós SE (EE-24h) quando comparados com seus respectivos grupos controle (CC-CTR e EE-CTR) (\* $p= 0.0387$  e \*\* $p= 0.0034$ , respectivamente). A atividade de SOD é maior o quando comparamos o grupo CC-24h e EE-24h com o grupo CE-Naive (\*\* $p= 0.0030$  e \*\* $p= 0.0072$ , respectivamente). Não houve diferença entre os grupos CE-Naive e CE-24h; A1) Na comparação entre os grupos controle, a atividade de SOD no grupo CC-CTR é maior que o grupo EE-CTR (\*\* $p= 0.0026$ ), não houve diferença nas demais comparações entre CE-Naive e EE-CTR; e A2) Na comparação entre os grupos experimentais, a atividade de SOD é menor no grupo CE-24h quando comparado com CC-24h e EE-24h ( $p<0,05$ ). B) Não houve diferença significativa na atividade da catalase entre os grupos. C) Não houve diferença significativa na atividade da glutathiona peroxidase entre os grupos.

#### 4.5 Quantificação do conteúdo tiol total

Quantificação do conteúdo tiol total em hipocampo de ratos submetidos ao SE. Os animais mantidos em claro constante e escuro constante apresentaram redução significativa do conteúdo total de SH (**Fig. 12**). Foi observado a diminuição dos níveis de SH no grupo de animais mantidos em claro constante e induzidos ao SE (CC-24h,  $0.2610 \pm 0.02$ ) e no grupo de animais controles mantidos em claro constante (CC-CTR,  $0.3114 \pm 0.05$ ), quando comparado com o grupo controle de animais mantidos em ciclo normal de claro-escuro (CE-Naive,  $0.6230 \pm 0.07$ ) ( $p < 0.01$ ). Os níveis de SH também estavam diminuídos nos grupos EE-24h ( $0.3683 \pm 0.03$ ) e EE-CTR ( $0.2582 \pm 0.02$ ), quando comparados com o grupo CE-Naive ( $0.6230 \pm 0.07$ ) ( $p < 0.007$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos CE-Naive e CE-24h, CC-CTR e CC-24h, e EE-CTR e EE-24h.



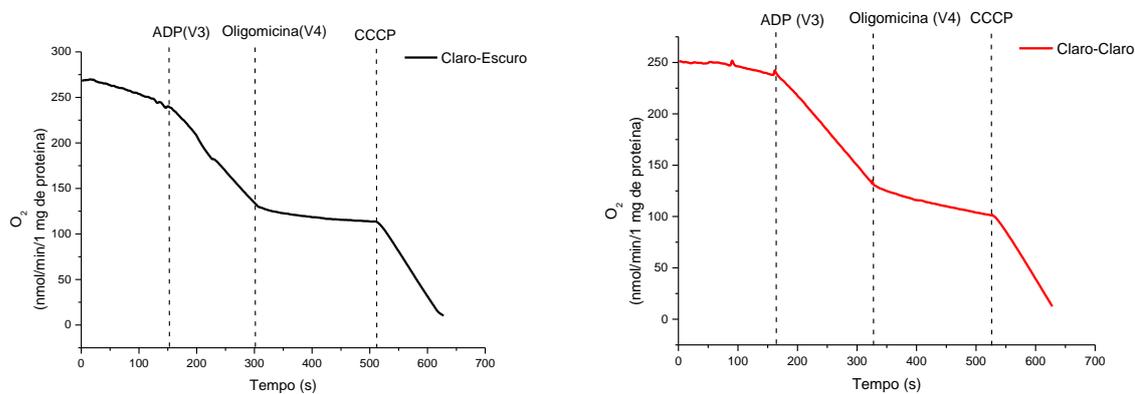
**Figura 12** | Quantificação do conteúdo tiol total em hipocampo de ratos submetidos ao SE e eutanasiados 24h após o SE (fase aguda). O gráfico de barras representa o conteúdo tiol total em ratos mantidos em ciclos normal de claro e escuro (CE-Naive e CE-24h), animais mantidos em claro constante (CC-CTR e CC-24h), e animais mantidos em escuro constante (EE-CTR e EE-24h). Os valores foram expressos em média  $\pm$ S.E.M (n=6-8). \*\* $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.007$  quando comparado com o grupo CE-Naive.

#### 4.6 Respiração mitocondrial

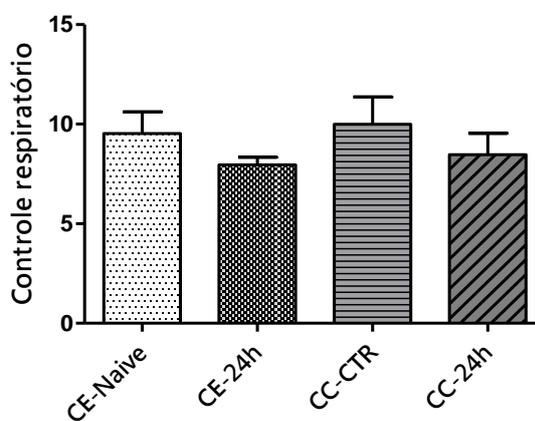
Para determinar se ocorre disfunção mitocondrial na cadeia transportadora de elétrons na fase aguda da epileptogênese em animais submetidos a alteração de ritmo circadiano, nós isolamos e analisamos as mitocôndrias do córtex cerebral de ratos eutanasiados 24h após o SE, e avaliamos a respiração mitocondrial. Nós utilizamos substrato respiratório para o complexo I da cadeia respiratória. O consumo de oxigênio avaliado no oxígrafo foi visto de acordo Chance (1995) e adaptações. Inicialmente foram adicionados EGTA (quelante de cálcio) e substratos para o complexo I (SI) seguidos da adição de mitocôndrias, que inicia naturalmente o consumo de oxigênio a uma velocidade basal, chamada de  $V_2$ . Posteriormente o ADP foi adicionado provocando um intenso declive da curva, correspondente ao intenso consumo de oxigênio ou velocidade de fosforilação, conhecida também como  $V_{3ADP}$ . Logo após a fosforilação oxidativa, a curva inicial uma tendência de platô, momento no qual todo o  $O_2$  foi consumido e convertido em ATP, paralelo ao eixo x, a derivada deste intervalo é chamada de  $V_4$ . A Oligomicina foi adicionada para induzir ainda mais esse platô, e esse estado é conhecido como repouso ou  $V_4$ . Ao final do processo, o desacoplador químico CCCP foi adicionado, provocando um efeito similar a  $V_3$  que é conhecido como estado de desacoplamento ou  $V_{CCCP}$  (**Fig. 13**).

Um dos principais parâmetros para determinação da viabilidade mitocondrial é o controle respiratório (CR). O CR pode ser calculado a partir da razão entre a velocidade de fosforilação e a velocidade de repouso ( $V_3/V_4$ ). O CR variou entre 7.9-9.9, indicando uma boa qualidade das mitocôndrias isoladas (**Fig. 13**). Nós não observamos diferença entre os grupos na respiração basal, na velocidade de fosforilação, no estado de repouso induzido pela oligomicina, no desacoplamento induzido pelo CCCP, e no controle respiratório (**Tabela 6**). Nossos resultados de respiração mitocondrial indicam que a alteração de fotoperíodo seguida da indução do SE não prejudica o consumo de oxigênio.

A



B



**Figura 13** | Respiração mitocondrial de cérebro de rato. Mitocôndrias de cérebro de rato (0,5 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 28°C contendo substratos para o complexo I 5mM, EGTA 200  $\mu$ M, ADP 200  $\mu$ M e oligomycin 1  $\mu$ g/mL. (A) Figura representativa da respiração mitocondrial de experimentos independentes realizados em duplicata. (B) Controle Respiratório (V3/V4Oligo). As barras representam a média  $\pm$  S.E.M One-Way ANOVA (n = 4-6).

**Tabela 6 - Respiração mitocondrial em cérebro de ratos induzidos ao SE**

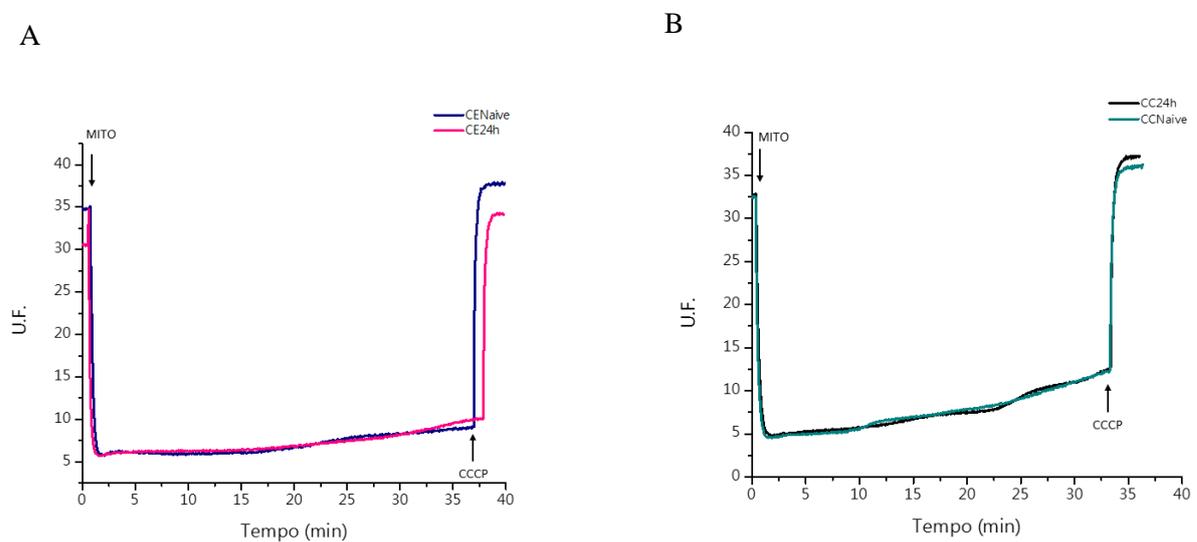
	Respiração Basal		V3 (ADP)		V4 (Oligomicina)	
	Controle	24h Pós-SE	Controle	24h Pós-SE	Controle	24h Pós-SE
Claro-Escuro	10.08 ± 0.6521	11.84 ± 0.9365	38.6 ± 3.453	40.76 ± 3.361	4.282 ± 0.5601	5.152 ± 0.4208
Claro-Claro	14.00 ± 1.155	15.74 ± 2.021	45.5 ± 3.259	44.98 ± 1.768	4.723 ± 0.5513	5.579 ± 0.6399
	Desacoplado (CCCP)		Controle Respiratório			
	Controle	24h Pós-SE	Controle	24h Pós-SE		
Claro-Escuro	52.39 ± 5.743	54.51 ± 5.941	9.537 ± 1.085	7.954 ± 0.3848		
Claro-Claro	63.83 ± 3.098	61.87 ± 6.763	9.999 ± 1.369	8.464 ± 1.074		

N= 4-6 por grupo

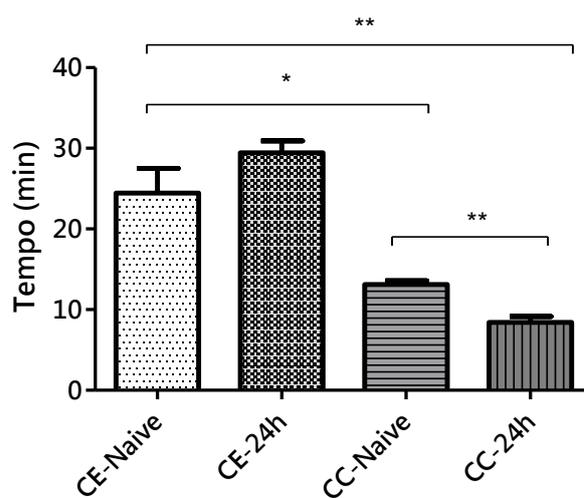


#### 4.7 Potencial elétrico de membrana mitocondrial

O potencial elétrico de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), pode ser estimado pela variação da fluorescência da safranina, registrada através de um espectrofluorímetro, em que o aumento da intensidade de fluorescência da safranina está relacionado à perda do potencial. Nós observamos diferença no potencial de membrana mitocondrial entre os grupos com alteração de fotoperíodo, claro constante e animais com ciclos normais de claro e escuro, submetidos ao SE e eutanasiados 24h após o SE. O tempo inicial (min) onde ocorreu a perda do potencial (aumento da fluorescência) foi estimado para todos os grupos: CE-Naive  $24.45 \pm 3.074$ ; CE-24h  $29.45 \pm 1.480$ ; CC-Naive  $13.13 \pm 0.4504$ ; CC-24h  $8.430 \pm 0.7227$ . Como podemos ver, os grupos do claro constante induziram uma dissipação do potencial elétrico de membrana mitocondrial mais rápida que nos grupos claro-escuro. Foi observada também uma diferença entre os grupos claro-claro naive e claro-claro 24h (**Fig.14**).



C



**Figura 14** | Efeito da alteração do fotoperíodo no potencial elétrico de membrana mitocondrial. (A e B) Gráficos representativos de 4-6 experimentos independentes realizados em duplicata. (C) As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. teste t e One-Way ANOVA e post hoc de Dunnett  $p < 0,05$ . MITO= Mitocôndria

## **5 Discussão**

Com objetivo de analisar o papel de alterações no ritmo circadiano sobre as crises epilépticas e epileptogênese, nós condicionamos os animais a períodos de claro constante e de escuro constante e analisamos alguns parâmetros celulares, moleculares e comportamentais antes, durante e após o SE. Este é um dos primeiros estudos que investiga a influência de alterações no ritmo circadiano causadas pelo claro constante e escuro constante no SE e epileptogênese.

Primeiramente nós analisamos o tempo de latência para SE e gravidade das crises durante o SE. Nossos resultados mostraram que o tempo de latência para o início do SE foi maior no grupo de animais mantidos na condição de claro constante. Para estes animais o tempo médio para a primeira crise de nível  $\geq 3$  foi de  $38.95 \pm 3.659$  min, enquanto que para os animais do grupo de animais mantidos em ciclos normais de 12h de claro e 12h de escuro, o tempo médio foi de  $29.50 \pm 2.552$  min. Os animais do grupo claro-claro foram mantidos em condições constantes de iluminação, alimentação e temperatura. Após as duas semanas de claro constante, os animais mostraram um padrão alterado de atividade locomotora que indica a dessincronização do ritmo circadiano (dados não mostrados), e foram submetidos ao protocolo de indução de SE. Portanto, a resposta do aumento do tempo de latência para o início das crises e o SE observado é influenciado pelo ritmo circadiano gerado endogenamente. Sabe-se que a exposição contínua à luz provoca dessincronização de neurônios, mas não compromete sua capacidade de gerar ritmos circadianos (OHTA; YAMAZAKI; MCMAHON, 2005), sabe-se que a dessincronização circadiana também acontece e em tecidos periféricos (POLIDAROVÁ et al., 2011). A dessincronização de neurônios do SNC pode explicar o tempo prolongado para a emergência das crises. Por outro lado, foi evidenciado que em roedores com ELT ou crises límbicas, a latência para crises foi menor e mais crises espontâneas ocorreram na fase clara do ciclo, estes dados foram coletados de animais mantidos em ciclos normais de 12h de claro -12h de escuro (QUIGG et al., 2000; HOFSTRA; DE WEERD, 2009). A influência de fatores endógenos e exógenos que regulam o ritmo circadiano e o papel disto no tempo para o SE ainda não é conhecido.

Na segunda etapa das análises do SE, o nível de gravidade das crises comportamentais foi classificado e quantificado. Os níveis das crises foram classificados de acordo com a escala de RACINE (1972). Nós observamos que os animais mantidos em claro constante e escuro constante tiveram crises menos graves quando comparados com animais mantidos em ciclos normais de 12h claro/12h escuro, durante o SE. Este é o primeiro estudo que analisa a influência do claro constante e do escuro constante na gravidade das crises durante o SE

As crises epilépticas refletem atividade elétrica anormal e paroxística acometendo uma ou várias áreas do córtex cerebral e que pode ser causada por inúmeras patologias estruturais ou neuroquímicas (Palmini, *et al.*, 1998; Chang & Lowenstein, 2003). Dentro de um foco de crise cada neurônio tem uma resposta elétrica sincronizada e estereotipada, em que ocorre a despolarização repentina, intensa (20-40 mV) e de longa duração (50-200 ms), que deflagra uma alta frequência de potenciais de ação. O início da circuitaria epiléptica dar-se pela hiperexcitabilidade dos neurônios e pelo o hipersincronismo de redes neuronais (KANDEL *et al.*, 2000). O hipersincronismo se refere a uma população de neurônios disparando ao mesmo tempo e em ritmos similares e a hiperexcitabilidade se refere a um nível de excitabilidade acima do limiar para geração de crise. (STAFSTROM, 2006). Quando as condições de excitação excedem a inibição em quaisquer regiões do cérebro pode haver a emergência de crise epiléptica, e se a atividade do foco de crise for suficientemente intensa, a atividade elétrica pode se espalhar para outras regiões do cérebro. Essa propagação segue as mesmas vias que as da atividade cerebral normal (KANDEL *et al.*, 2000). No modelo de ELT induzida por pilocarpina, utilizado no presente trabalho, os registros EEG durante e após o SE demonstraram que a pilocarpina pode evocar eventos epilépticos ictais e interictais, bem como que esses padrões de EEG estão correlacionados com alterações comportamentais. Quando as crises comportamentais se tornam mais graves, EEG mostra uma atividade rápida de alta voltagem no hipocampo. Esta atividade parece originar-se no hipocampo e se propagar para o amígdala e neocórtex (CURIA *et al.*, 2008).

Os mecanismos que fazem com que os animais mantidos em ciclos de claro constante e escuro constante apresentem crises menos graves pode dar-se por diferentes mecanismos, visto que as alterações circadianas em animais mantidos em claro constante e escuro constante são diferentes. Anteriormente, nós observamos que em animais mantidos no claro constante por duas semanas o ritmo de atividade locomotora está dessincronizado, enquanto que nos animais mantidos em escuro constante há um “arrastamento” de fase e o ciclo endógeno apresenta uma ritmicidade de um pouco mais de 24 horas (dados não mostrados). Neste sentido, outra via que pode explicar as crises mais leves no escuro constante é através da melatonina. Sabemos que a luz é fundamental para a produção e regulação da melatonina endógena. Estudos mostraram que apesar da supressão da atividade da glândula pineal - principal produtora de melatonina - induzida pela luz constante (CALINESCU *et al.*, 2011), os níveis deste hormônio não são alterados na condição de claro constante, sugerindo que a sua produção é compensada por outros órgãos. Enquanto que em animais mantidos em escuro constante há o aumento significativo dos níveis de melatonina sérica (FARHADI; GHARGHANI; FARHADI, 2016).

Alguns estudos utilizando modelos experimental com roedores, mostram um papel anticonvulsivante da melatonina (TCHEKALAROVA et al., 2015). Em estudos realizados com pacientes epiléticos foi observado que os níveis de melatonina estão aumentado após a crise, levantando a hipótese de que o aumento da melatonina pode fazer parte de um mecanismo anticonvulsivante endógeno (SCHAPPEL et al., 1995). Os efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores da melatonina foram vistos em modelo de ELT induzida por cainato (TCHEKALAROVA et al., 2010; PETKOVA et al., 2014). A atividade antioxidante da melatonina e a baixa toxicidade tornam-na um potencial adjuvante para o tratamento da epilepsia. Neste sentido, a gravidade das crises epiléticas de animais mantidos no escuro constante pode estar relacionada aos níveis de melatonina elevados neste grupo. Nossos dados demonstram que o condicionamento dos animais ao livre curso, em resposta ao escuro constante e a dessincronização do ritmo circadiano induzida pelo claro constante, parece retardar e minimizar os efeitos da atividade elétrica anormal de redes neurais, principalmente no hipocampo. No entanto, o mecanismo pelo qual as alterações de fotoperíodo que levam ao aumento do tempo de latência e diminuição da gravidade das crises comportamentais no SE ainda precisa ser elucidado.

O hipocampo é uma região do cérebro identificada como um importante oscilador periférico em mamíferos. No trabalho de DEBSKI et al. (2017), foi observado que a expressão de genes e proteínas exibe oscilações circadianas no hipocampo de animais epiléticos. Essas oscilações podem ser interrompidas ou alteradas em doenças e podem contribuir para a fisiopatologia da doença. Para entender as implicações do claro e do escuro constante no relógio molecular circadiano, durante a fase aguda da epileptogênese, nós avaliamos o perfil de expressão de genes reguladores da maquinaria molecular circadiana, conhecidos como genes do relógio (*Clock*, *Bmal*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per3*). Quando analisamos o perfil de expressão do gene *Clock* nos animais com ciclos normais de claro-escuro a expressão não varia entre o grupo naive e o grupo 24h pós-SE. Em um trabalho anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, nós observamos que *Clock* apresenta um padrão de expressão não-cíclico em ciclos normais de claro-escuro (DA SILVA SANTOS et al., 2015). Em outro estudo do nosso grupo de pesquisa, foi visto que o perfil não-cíclico de expressão de *Clock* é mantido após o SE e na epilepsia (MATOS et al., 2018). Entretanto, nos animais mantidos em claro constante os níveis de RNAm de *Clock* é maior no grupo CC-24h quando comparado com o grupo CC-Controle. O mesmo perfil de expressão é visto quando comparamos os animais mantidos em escuro constante, *Clock* é super-expresso no grupo EE-24h em comparação com o grupo EE-Controle,

indicando que mudanças no ritmo circadiano dos animais, altera o perfil de expressão de um dos principais genes reguladores do relógio molecular na fase aguda da epileptogênese.

Nós observamos que o perfil de expressão de *Bmal*, *Cry1* e *Cry2* é o mesmo tanto na condição normal de claro-escuro quanto no claro e escuro constante. Estes genes apresentam níveis de expressão aumentados nos grupos de animais induzidos ao SE em comparação com seus grupos controle. Já nas comparações intra-grupos dos animais eutanasiados 24h após o SE, o nosso estudo mostrou que a expressão de *Bmal*, *Cry1* e *Per1* é maior no grupo experimental mantido no escuro constante em comparação com o grupo claro constante e grupo claro-escuro. Para *Cry2*, os níveis de transcritos são maiores no grupo escuro constante em comparação com os grupos claro constante e claro-escuro; e no grupo claro constante em comparação ao grupo claro-escuro. Para *Per3*, foi visto uma super-expressão apenas no grupo claro constante em comparação ao grupo claro-escuro.

As mudanças na fisiologia e no comportamento geradas pelo relógio molecular de 24h, está ligada a regulação transcricional dos genes do relógio. Esta maquinaria molecular, por sua vez, é resistente a modificações nas taxas globais de transcrição (CHO, 2012). De fato, nossos resultados mostram que o padrão de expressão permanece o mesmo nas comparações entre grupos controles e experimentais, entretanto, nas comparações intra-grupo, os níveis de RNAm são mais elevados nos grupos de animais que foram submetidos as condições de claro constante e escuro constante. Ou seja, não há variação no perfil de expressão destes genes do relógio nas diferentes condições experimentais, mas o nível de expressão intra-grupo está alterado, mostrando que as mudanças no ritmo circadiano dos animais estão relacionadas com a alteração do nível de expressão destes genes na fase aguda da epileptogênese. Nossos resultados sugerem que as variações nos níveis de transcritos dos genes do relógio no hipocampo podem atuar na atividade elétrica cerebral, contribuindo para o aumento da latência e/ou diminuição da gravidade das crises na fase aguda da epileptogênese.

Nós também analisamos o perfil de expressão de genes que sabidamente participam do processo epileptogênico. O neuropeptídeo Y (*Npy*), conhecido por fazer parte de um grupo de genes com ação anticonvulsivante, apresentou um perfil de expressão semelhante nas três condições, super-expresso nos grupos claro-escuro 24h, claro-claro 24h e escuro-escuro 24h quando comparado com seus respectivos grupos controle. Assim como o nosso trabalho, vários outros estudos têm relatado um aumento da expressão de genes com atividade inibitória após crises epilépticas. Hoje sabe-se que nem sempre os genes que participam do processo anticonvulsivante apresentam uma expressão diminuída. Estes dados, aparentemente paradoxais, podem estar relacionados a mecanismos compensatórios do fenômeno de

hiperexcitabilidade neuronal. Entretanto, nas comparações intra-grupo, *Npy* é sub-expresso nos grupos claro-claro 24h e escuro-escuro 24h em comparação com o grupo claro-escuro 24h. Este dado sugere que, apesar do perfil de expressão de *Npy* se manter super-expresso independente da condição ambiental, nas condições de claro constante e escuro constante os níveis diminuídos dos transcritos podem ser resultado das crises menos graves durante o SE observadas nestes grupos.

O gene *Tnfa* que está envolvido com o sistema imune, e participa de processos inflamatórios na ELT, teve o perfil de expressão semelhante nas três condições. Está super-expresso nos grupos claro-escuro 24h, claro-claro 24h e escuro-escuro 24h quando comparado com seus respectivos grupos controle. A neuroinflamação é um importante mecanismo no processo epileptogênico. Estudos com humanos e em animais com crises epiléticas induzidas química ou eletricamente apresentam um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como *Tnfa* na ELTM-EH (LEAL et al., 2018). A interação funcional que existe entre citocinas e neurotransmissores leva ao aumento desses mediadores inflamatórios e pode influenciar a excitabilidade neuronal e a resposta do cérebro as crises (DE SIMONI et al., 2000). Estudos mostram que o gene *Cry1* tem um papel funcional como regulador negativo de processos inflamatórios (QIN; DENG, 2015). Foi visto que, a super-expressão do *Cry1* diminuiu ativação da expressão do gene *Tnfa* (YANG et al., 2015). Considerando estes fatores, e o fato de que o *Tnfa* e outras citocinas estão elevados após SE, é possível que a super-expressão de *Cry1* logo após o SE seja resultado de uma atividade anti-inflamatória compensatória (MATOS et al., 2018).

Nós analisamos também a expressão diferencial de dois genes envolvidos na neurotransmissão GABAérgica, *Gad65* e *Gad67*. Tanto o *Gad65* quanto o *Gad67* são expressos em regiões do cérebro contendo neurônios inibitórios. Dados da literatura mostram que há super-expressão de *Gad65* e *Gad67* no hipocampo de ratos (ESCLAPEZ; HOUSER, 1999; DAIF et al., 2018). Alguns estudos propuseram que o aumento da expressão de RNAm e proteínas de GAD são dependentes da atividade de neurônios GABAérgicos no hipocampo. Em nossos resultados, o aumento da expressão de *Gad65* foi maior apenas nos grupos claro-escuro e claro-claro induzidos ao SE em comparação aos seus respectivos grupos controle. Nas comparações intra-grupos experimentais, os níveis de *Gad65* foi maior no grupo claro-escuro 24h em comparação com os grupos claro-claro e escuro-escuro 24h. Entretanto, para *Gad67* os níveis de transcritos foram significativamente menores nos grupos experimentais claro-claro e escuro-escuro 24h. Este dado sugere que a sub-expressão de *Gad67* em condições de claro constante e escuro constante, pode levar a diminuição da expressão da enzima GAD67, que é

crucial para a síntese de GABA, refletindo no funcionamento de interneurônios inibitórios. Este pode ser um mecanismo de proteção que ajuda a limitar a atividade convulsivante.

Outro gene que tem seu papel bem conhecido no processo epileptogênico é *Gfap* (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*), a super-expressão deste gene está relacionado ao processo de astrogliose que acompanha insultos epileptogênicos (MORIMOTO; FAHNESTOCK; RACINE, 2004). Em nossos dados, *Gfap* está super-expresso nos grupos claro-escuro 24h, claro-claro 24h e escuro-escuro 24h quando comparado com seus respectivos grupos controle. Sabe-se que expressão gênica e células positivas para GFAP estão significativamente aumentadas durante a epileptogênese, processo que se inicia logo após a administração de pilocarpina em ratos. Este padrão de expressão gênica se manteve em nossos grupos experimentais na fase aguda da epileptogênese.

Em biópsias de pacientes fármaco-resistente com ELT que foram submetidos à cirurgia de epilepsia para controle das crises, as principais alterações neuropatológicas encontradas são perda de células neuronais e astrogliose, um processo conhecido como esclerose hipocampal. Em nosso trabalho, nós utilizando o modelo experimental de epilepsia induzida pelo convulsivante químico, a pilocarpina. Este modelo experimental mimetiza os danos causados pela ELT em humanos. Nele é possível observar uma perda neuronal como consequência do SE (CURIA et al., 2008). Quando quantificamos a morte neuronal no hipocampo induzida pelo SE, foi observado que os animais mantidos em claro constante e eutanasiados 7 dias após o SE, não apresentaram perda neuronal na região do hilo do giro denteado, indicando que o claro constante pode atenuar a morte neuronal nesta fase da epileptogênese. Este fenômeno pode ser explicado pela presença de crises menos graves durante o SE.

Para entender o papel do metabolismo energético nas crises epiléticas e da progressão da epileptogênese na ELT, é importante avaliar o papel da mitocôndria e do estresse oxidativo nestes processos. As mitocôndrias desempenham várias funções celulares que tem um impacto direto e/ou indireto na hiperexcitabilidade neuronal, como a geração de ATP, biossíntese de metabólitos/neurotransmissores, homeostase do cálcio, controle da morte celular e são o principal local de produção e controle de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ROWLEY; PATEL, 2013). Os efeitos biológicos da produção de espécies reativas de oxigênio são controlados pela ação de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Entretanto, foi visto que a epilepsia altera gravemente o sistema antioxidante (PUTTACHARY et al., 2015). Neste trabalho, nós vimos que a atividade da enzima SOD é maior nos grupos experimentais de animais mantidos em condições de claro constante e escuro constante e pós-SE, quando comparados com seus

respectivos controles e com os grupos de animais mantidos em ciclos normais de 12h de claro e 12h de escuro. Nós não observamos mudanças significantes na atividade da catalase e GPx. Estudos anteriores, observaram uma diminuição significativa na atividade de GR, SOD e CAT no hipocampo de animais epiléticos induzidos por pilocarpina em comparação com animais controle. Grupos tíois reduzidos são encontrados no aminoácido cisteína, que é constituinte de inúmeras proteínas. Quando a geração de EROs é elevada, tais grupos SH podem se oxidados, entretanto, nas análises de quantificação de grupos tíois (SH), os níveis de SH foi menor nos grupos de animais mantidos do claro constante e escuro constante. Estudos recentes indicam que o metabolismo celular básico e o equilíbrio de EROs são regulados por uma ritmicidade de 24 horas. Além da variação diurna de EROs devido à regulação circadiana da fosforilação oxidativa, alguns estudos indicam que o relógio circadiano molecular tem ligação direta com etapas importantes da regulação da produção e eliminação de EROs (BERATAN; ONUCHIC, 2012). Em um estudo realizado por ROWLEY et al. (2015) foi visto que em modelo experimental de ELT ocorrem déficits na respiração mitocondrial e este prejuízo está associado ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) iniciadas pelo insulto epileptogênico.

Com o objetivo de analisar de uma forma mais profunda a bioenergética mitocondrial na alteração do ritmo circadiano de animais pós-SE, nós primeiramente analisamos a respiração mitocondrial, que é um dos principais parâmetros para avaliar disfunção mitocondrial, no âmbito da cadeia transportadora de elétrons. Neste trabalho, verificamos mais especificamente a atividade do complexo I da cadeia respiratória. Nossos dados mostram que não houve déficit na respiração mitocondrial na fase aguda da epileptogênese. Independentemente da sua origem, as crises representam uma demanda excessiva de energia no cérebro (ZSURKA; KUNZ, 2015). Neste sentido, a disfunção mitocondrial tem sido descrita em vários distúrbios epiléticos, na tentativa de analisar alterações metabólicas acopladas ao processo epileptogênico da epilepsia do lobo temporal (ELT).

A manutenção do potencial de membrana mitocondrial é fundamental para a síntese de ATP e viabilidade da mitocôndria, por isso trata-se de uma ferramenta importante na avaliação da integridade mitocondrial. A perda da manutenção do potencial de membrana pode levar, em última instância, à morte celular. Em nossos dados, foi visto que a dissipação do potencial elétrico de membrana mitocondrial é mais rápida nos grupos claro-claro do que nos grupos claro-escuro. Foi observada também uma diferença entre os grupos claro-claro controle e claro-claro 24h. Entretanto, o impacto funcional das crises nas vias de produção de energia celular ainda é desconhecido

## **6 Conclusão**

Este estudo mostra a influência de alterações no ritmo circadiano que dar-se pelo claro constante e escuro constante, no SE e na fase aguda e latente da epileptogênese. Foi demonstrado que o condicionamento dos animais ao claro constante antes da indução do SE, aumentou o tempo de latência para o início do SE. Além de que, tanto nos animais mantidos em claro constante, quanto nos animais mantidos no escuro constante antes do SE, as os níveis das crises comportamentais são menos graves. Além de observar que a exposição constante ao claro e ao escuro diminui a gravidade das crises durante SE, altera tanto o padrão de expressão de genes reguladores do relógio molecular endógeno (*Clock*, *Bmal*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* e *Per3*), quanto de genes que fazem parte do processo epileptogênico (*Npy*, *Gad65*, *Gad67*, *TNF $\alpha$*  e *Gfap*). Nossos dados mostram o aumento a atividade de uma enzima oxidante, a SOD, 24h após o SE, e diminuição dos grupos tiólicos reduzidos, indicando que há um aumento da geração de EROs. Por outro lado, foi visto ainda que no claro constante a neurodegeneração induzida pelo SE é diminuída. Quanto a bioenergética mitocondrial, nós observamos que a respiração mitocondrial de animais mantidos em claro constante e induzidos ao SE não é prejudicada, entretanto neste grupo a dissipação do potencial elétrico de membrana é mais rápida do que em animais mantidos em ciclos de claro-escuro. Em conjunto, estes dados sugerem que alterações no ritmo circadiano minimizam os efeitos do SE e da epileptogênese.

## **Referências bibliográficas**

AEBI, H. [13] Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, 1984.

ARIDA, R. M.; SCORZA, F. A.; DE ARAUJO PERES, C.; CAVALHEIRO, E. A. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Research**, 1999.

ARONICA, E.; BAUER, S.; BOZZI, Y.; CALEO, M.; DINGLEDINE, R.; GORTER, J. A.; HENSHALL, D. C.; KAUFER, D.; KOH, S.; LÖSCHER, W.; LOUBOUTIN, J. P.; MISHTO, M.; NORWOOD, B. A.; PALMA, E.; POULTER, M. O.; TERRONE, G.; VEZZANI, A.; KAMINSKI, R. M. Neuroinflammatory targets and treatments for epilepsy validated in experimental models. **Epilepsia**, 2017.

BAXENDALE, S. A. Light therapy as a treatment for epilepsy. **Medical Hypotheses**, 2011.

BEDROSIAN, T. A.; NELSON, R. J. Timing of light exposure affects mood and brain circuits. **Translational Psychiatry**, 2017.

BEN-MENACHEM, E.; KYLLERMAN, M.; MARKLUND, S. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. **Epilepsy Research**, 2000.

BENSON, M. J.; MANZANERO, S.; BORGES, K. Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models. **Epilepsia**, 2015.

BERATAN, D. N.; ONUCHIC, J. N. Redox redux. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 40, p. 13728, 2012.

BERG, A. T.; ENGEL, J. Hippocampal atrophy and the prognosis of epilepsy: Some answers, more questions. **Neurology**, 2006.

BERTRAM, E. H.; CORNETT, J. F. The evolution of a rat model of chronic spontaneous limbic seizures. **Brain Research**, 1994.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal Biochem**, 1976.

BRAND, M. D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochemical Journal**, v. 437, n. 3, p. 575.1-575, 2011. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ4370575u>>.

BUCKMASTER, P. S. Mossy fiber sprouting in the dentate gyrus. **Epilepsia**, 2010.

CALINESCU, A.-A.; LIU, T.; WANG, M. M.; BORJIGIN, J. Transsynaptic Activity-Dependent Regulation of Axon Branching and Neurotrophin Expression In Vivo. **Journal of Neuroscience**, 2011.

CANNON, C. P.; MCCABE, C. H.; STONE, P. H.; SCHACTMAN, M.; THOMPSON, B.; THEROUX, P.; GIBSON, R. S.; FELDMAN, T.; KLEIMAN, N. S.; TOFLER, G. H.; MULLER, J. E.; CHAITMAN, B. R.; BRAUNWALD, E. Circadian variation in the onset of unstable angina and non-Q-wave acute myocardial infarction (the TIMI III registry and TIMI IIIB). **American Journal of Cardiology**, 1997.

CASSETTA, I.; GRANIERI, E.; PORTALUPPI, F.; MANFREDINI, R. **Circadian variability in hemorrhagic stroke [5]****Journal of the American Medical Association**, 2002. .

CHANDRASHEKARAN, M. K. **Biological rhythms research: A personal account****Journal of Biosciences**, 1998. .

CHATZIKONSTANTINOOU, A. Epilepsy and the hippocampus. **The Hippocampus in Clinical Neuroscience**, v. 34, p. 121–142, 2014.

CHO, C.-H. Molecular mechanism of circadian rhythmicity of seizures in temporal lobe epilepsy. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 6, n. November, p. 1–9, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2012.00055/abstract>>.

COHEN, M. C.; ROHTLA, K. M.; LAVERY, C. E.; MULLER, J. E.; MITTLEMAN, M. A. Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death. **American Journal of Cardiology**, 1997.

CURIA, G.; LONGO, D.; BIAGINI, G.; JONES, R. S. G.; AVOLI, M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods**, 2008.

DA SILVA SANTOS, E. A.; MARQUES, T. E. B. S.; DE CARVALHO MATOS, H.; LEITE, J. P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; PAÇÓ-LARSON, M. L.; GITAI, D. L. G. Diurnal variation has effect on differential gene expression analysis in the hippocampus of the pilocarpine-induced model of mesial temporal lobe epilepsy. **PLoS ONE**, 2015.

DAIF, A.; LUKAS, R. V.; ISSA, N. P.; JAVED, A.; VANHAERENTS, S.; REDER, A. T.; TAO, J. X.; WARNKE, P.; ROSE, S.; TOWLE, V. L.; WU, S. **Antiglutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) antibody-associated epilepsy****Epilepsy and Behavior**, 2018. .

DE ARAÏJO, M. A.; MARQUES, T. E. B. S.; OCTACÍLIO-SILVA, S.; DE ARROXELAS-SILVA, C. L.; PEREIRA, M. G. A. G.; PEIXOTO-SANTOS, J. E.; KANDRATAVICIUS, L.; LEITE, J. P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; CASTRO, O. W.; DUZZIONI, M.; PASSOS, G. A.; PAÇÓ-LARSON, M. L.; GITAI, D. L. G.

Identification of microRNAs with dysregulated expression in status epilepticus induced epileptogenesis. **PLoS ONE**, 2016.

DE GOEDE, P.; WEFERS, J.; DE GOEDE, P.; WEFERS, J.; BROMBACHER, E. C.; SCHRAUWEN, P.; KALSBECK, A. Circadian rhythms in mitochondrial respiration. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5854864/pdf/jme-60-R115.pdf>>.

DE SIMONI, M. G.; PEREGO, C.; RAVIZZA, T.; MONETA, D.; CONTI, M.; MARCHESI, F.; DE LUIGI, A.; GARATTINI, S.; VEZZANI, A. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. **The European journal of neuroscience**, 2000.

DEBSKI, K.; CEGLIA, N.; GHESTEM, A.; IVANOV, A.; BRANCATI, G. E.; BROER, S.; BOT, A.; MULLER, A.; SCHOCH, S.; BECKER, A.; LOSCHER, W.; SASSONE-CORSI, P.; LUKASIUK, K.; BALDI, P.; BERNARD, C. The circadian hippocampus and its reprogramming in epilepsy: impact for chronotherapeutics. **bioRxiv**, 2017.

DEVINSKY, O.; VEZZANI, A.; NAJJAR, S.; DE LANEROLLE, N. C.; ROGAWSKI, M. A. **Glia and epilepsy: Excitability and inflammation** *Trends in Neurosciences*, 2013. .

DEVINSKY, O.; VEZZANI, A.; O'BRIEN, T. J.; JETTE, N.; SCHEFFER, I. E.; DE CURTIS, M.; PERUCCA, P. Epilepsy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. May, 2018.

DINGLEDINE, R.; COULTER, D. A.; FRITSCH, B.; GORTER, J. A.; LELUTIU, N.; MCNAMARA, J.; NADLER, J. V.; PITKÄNEN, A.; ROGAWSKI, M. A.; SKENE, P.; SLOVITER, R. S.; WANG, Y.; WADMAN, W. J.; WASTERLAIN, C.; ROOPRA, A. Transcriptional profile of hippocampal dentate granule cells in four rat epilepsy models. **Scientific Data**, 2017.

DUDEK, F. E.; STALEY, K. J. **The time course of acquired epilepsy: Implications for therapeutic intervention to suppress epileptogenesis** *Neuroscience Letters*, 2011. .

DURAZZO, T. S.; SPENCER, S. S.; DUCKROW, R. B.; NOVOTNY, E. J.; SPENCER, D. D.; ZAVERI, H. P. Temporal distributions of seizure occurrence from various epileptogenic regions. **Neurology**, 2008.

ENGEL, J. **Progress in epilepsy: Reducing the treatment gap and the promise of biomarkers** *Current Opinion in Neurology*, 2008. .

ERECIŃSKA, M.; SILVER, I. A. **Ions and energy in mammalian brain** *Progress in Neurobiology*, 1994. .

ESCLAPEZ, M.; HOUSER, C. R. Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Comparative Neurology**, 1999.

EYO, U. B.; MURUGAN, M.; WU, L. J. **Microglia–Neuron Communication in Epilepsy** *GLIA*, 2017. .

FARHADI, N.; GHARGHANI, M.; FARHADI, Z. Effects of long-term light, darkness and oral administration of melatonin on serum levels of melatonin. **Biomedical Journal**, 2016.

FIEST, K. M.; SAURO, K.; WIEBE, S.; PATTEN, S.; KWON, C.; DYKEMAN, J.; PRINGSHEIM, T.; LORENZETTI, D.; JETTE, N. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. **Neurology**, v. 88, n. 3, p. 296–303, 2017.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J. H.; ELGER, C. E.; ENGEL, J.; FORSGREN, L.; FRENCH, J. A.; GLYNN, M.; HESDORFFER, D. C.; LEE, B. I.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; SCHEFFER, I. E.; TOMSON, T.; WATANABE, M.; WIEBE, S. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014.

FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; FRENCH, J. A.; HIGURASHI, N.; HIRSCH, E.; JANSEN, F. E.; LAGAE, L.; MOSHÉ, S. L.; PELTOLA, J.; ROULET PEREZ, E.; SCHEFFER, I. E.; ZUBERI, S. M. 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.

FISHER, R. S.; VAN EMDE BOAS, W.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. **Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)** *Epilepsia*, 2005. .

GALLEGO, M.; VIRSHUP, D. M. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 139–148, 2007.

GBD 2015 DISEASE AND INJURY INCIDENCE AND PREVALENCE COLLABORATORS, G. 2015 D. and I. I. and P. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet (London, England)**, v. 388, n. 10053, p. 1545–1602, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27733282>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5055577>>.

GIBSON, E. M.; WANG, C.; TJHO, S.; KHATTAR, N.; KRIEGSFELD, L. J. Experimental

“jet lag” inhibits adult neurogenesis and produces long-term cognitive deficits in female hamsters. **PLoS ONE**, 2010.

GIORGI, F. S.; GUIDA, M.; CACIAGLI, L.; MAESTRI, M.; CARNICELLI, L.; BONANNI, E.; BONUCCELLI, U. **What is the role for EEG after sleep deprivation in the diagnosis of epilepsy? Issues, controversies, and future directions** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2014. .

GRABENSTATTER, H. L.; DEL ANGEL, Y. C.; CARLSEN, J.; WEMPE, M. F.; WHITE, A. M.; COGSWELL, M.; RUSSEK, S. J.; BROOKS-KAYAL, A. R. The effect of STAT3 inhibition on status epilepticus and subsequent spontaneous seizures in the pilocarpine model of acquired epilepsy. **Neurobiology of Disease**, 2014.

GUILHOTO, L. M. F. F.; LODDENKEMPER, T.; VENDRAME, M.; BERGIN, A.; BOURGEOIS, B. F.; KOTHARE, S. V. Higher evening antiepileptic drug dose for nocturnal and early-morning seizures. **Epilepsy and Behavior**, 2011.

HAMILTON, S. E.; LOOSE, M. D.; QI, M.; LEVEY, a I.; HILLE, B.; MCKNIGHT, G. S.; IDZERDA, R. L.; NATHANSON, N. M. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1997.

HARPER, D. G.; STOPA, E. G.; MCKEE, A. C.; SATLIN, A.; FISH, D.; VOLICER, L. Dementia severity and Lewy bodies affect circadian rhythms in Alzheimer disease. **Neurobiology of Aging**, 2004.

HASTINGS, M. H.; MAYWOOD, E. S.; BRANCACCIO, M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 453–469, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41583-018-0026-z>>.

HASTINGS, M. H.; REDDY, A. B.; MAYWOOD, E. S. A clockwork web: Circadian timing in brain and periphery, in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 8, p. 649–661, 2003.

HECK, N.; GARWOOD, J.; LOEFFLER, J. P.; LARMET, Y.; FAISSNER, A. Differential upregulation of extracellular matrix molecules associated with the appearance of granule cell dispersion and mossy fiber sprouting during epileptogenesis in a murine model of temporal lobe epilepsy. **Neuroscience**, 2004.

HELLIER, J. L.; PATRYLO, P. R.; BUCKMASTER, P. S.; DUDEK, F. E. Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: Assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, 1998.

HENSHALL, D. C.; HAMER, H. M.; PASTERKAMP, R. J.; GOLDSTEIN, D. B.; KJEMS, J.; PREHN, J. H. M.; SCHORGE, S.; LAMOTTKE, K.; ROSENOW, F. **MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility***The Lancet Neurology*, 2016. .

HENSHALL, D. C.; KOBOW, K. Epigenetics and epilepsy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2015.

HESTER, M. S.; DANZER, S. C. **Hippocampal granule cell pathology in epilepsy - A possible structural basis for comorbidities of epilepsy?***Epilepsy and Behavior*, 2014. .

HOFSTRA, W. A.; GORDIJN, M. C. M.; VAN DER PALEN, J.; VAN REGTEREN, R.; GROOTEMARSINK, B. E.; DE WEERD, A. W. 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eplesyres.2011.01.015>>.

HOFSTRA, W. Ae.; 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, 2009a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smr.2009.01.002>>.

HOFSTRA, W. Ae.; DE WEERD, A. W. **The circadian rhythm and its interaction with human epilepsy: A review of literature***Sleep Medicine Reviews*, 2009b. .

JORNAYVAZ, F. R.; SHULMAN, G. I. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays In Biochemistry**, 2010.

KADAM, S. D.; WHITE, A. M.; STALEY, K. J.; DUDEK, F. E. Continuous Electroencephalographic Monitoring with Radio-Telemetry in a Rat Model of Perinatal Hypoxia-Ischemia Reveals Progressive Post-Stroke Epilepsy. **Journal of Neuroscience**, 2010.

KALEYIAS, J.; LODDENKEMPER, T.; VENDRAME, M.; DAS, R.; SYED, T. U.; ALEXOPOULOS, A. V.; WYLLIE, E.; KOTHARE, S. V. Sleep-wake patterns of seizures in children with lesional epilepsy. **Pediatric Neurology**, 2011.

KANN, O.; KOVÁCS, R.; NJUNTING, M.; BEHRENS, C. J.; OTÁHAL, J.; LEHMANN, T. N.; GABRIEL, S.; HEINEMANN, U. Metabolic dysfunction during neuronal activation in the ex vivo hippocampus from chronic epileptic rats and humans. **Brain**, 2005.

KENNEY-JUNG, D. L.; VEZZANI, A.; KAHOU, R. J.; LAFRANCE-COREY, R. G.; HO, M. L.; MUSKARDIN, T. W.; WIRRELL, E. C.; HOWE, C. L.; PAYNE, E. T. Febrile infection-related epilepsy syndrome treated with anakinra. **Annals of Neurology**, 2016.

KOVAC, S.; DOMIJAN, A. M.; WALKER, M. C.; ABRAMOV, A. Y. Seizure activity results in calcium- and mitochondriaindependent ros production via nadph and xanthine oxidase activation. **Cell Death and Disease**, 2014.

KUHLMAN, S. J.; CRAIG, L. M.; DUFFY, J. F. Introduction to Chronobiology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. a033613, 2017. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a033613>>.

LAXER, K. D.; TRINKA, E.; HIRSCH, L. J.; CENDES, F.; LANGFITT, J.; DELANTY, N.; RESNICK, T.; BENBADIS, S. R. **The consequences of refractory epilepsy and its treatment***Epilepsy and Behavior*, 2014. .

LEAL, B.; CHAVES, J.; CARVALHO, C.; BETTENCOURT, A.; BRITO, C.; BOLEIXA, D.; FREITAS, J.; BRAS, S.; LOPES, J.; RAMALHEIRA, J.; COSTA, P. P.; DA SILVA, B. M.; DA SILVA, A. M. Immunogenetic predisposing factors for mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **The International journal of neuroscience**, 2018.

LIANG, L. P.; HO, Y. S.; PATEL, M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. **Neuroscience**, 2000.

LIU, A. C.; WELSH, D. K.; KO, C. H.; TRAN, H. G.; ZHANG, E. E.; PRIEST, A. A.; BUHR, E. D.; SINGER, O.; MEEKER, K.; VERMA, I. M.; DOYLE, F. J.; TAKAHASHI, J. S.; KAY, S. A. Intercellular Coupling Confers Robustness against Mutations in the SCN Circadian Clock Network. **Cell**, 2007.

MARTINO, T. A.; OUDIT, G. Y.; HERZENBERG, A. M.; TATA, N.; KOLETAR, M. M.; KABIR, G. M.; BELSHAM, D. D.; BACKX, P. H.; RALPH, M. R.; SOLE, M. J. **Circadian rhythm disorganization produces profound cardiovascular and renal disease in hamsters***Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2008. .

MARTINS DA SILVA, A.; AARTS, J. H. P.; BINNIE, C. D.; LAXMINARAYAN, R.; LOPES DA SILVA, F. H.; MEIJER, J. W. A.; NAGELKERKE, N. The circadian distribution of interictal epileptiform EEG activity. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, 1984.

MATOS, H. de C.; KOIKE, B. D. V.; PEREIRA, W. dos S.; DE ANDRADE, T. G.; CASTRO, O. W.; DUZZIONI, M.; KODALI, M.; LEITE, J. P.; SHETTY, A. K.; GITAÍ, D. L. G. Rhythms of Core Clock Genes and Spontaneous Locomotor Activity in Post-Status Epilepticus Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **Frontiers in Neurology**, 2018.

MAZARATI, A. M.; LEWIS, M. L.; PITTMAN, Q. J. Neurobehavioral comorbidities of epilepsy: Role of inflammation. **Epilepsia**, 2017.

MCCLELLAND, S.; BRENNAN, G. P.; DUBÉ, C.; RAJPARA, S.; IYER, S.; RICHICHI, C.; BERNARD, C.; BARAM, T. Z. The transcription factor NRSF contributes to epileptogenesis by selective repression of a subset of target genes. **eLife**, 2014.

MIRZOEV, A.; BERCOVICI, E.; STEWART, L. S.; CORTEZ, M. A.; SNEAD, O. C.; DESROCHER, M. **Circadian profiles of focal epileptic seizures: A need for reappraisal** *Seizure*, 2012. .

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, 1972.

MORIMOTO, K.; FAHNESTOCK, M.; RACINE, R. J. **Kindling and status epilepticus models of epilepsy: Rewiring the brain** *Progress in Neurobiology*, 2004. .

NGUGI, A. K.; BOTTOMLEY, C.; KLEINSCHMIDT, I.; SANDER, J. W.; NEWTON, C. R. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach. **Epilepsia**, v. 51, n. 5, p. 883–890, 2010.

NZWALO, H.; MENEZES CORDEIRO, I.; SANTOS, A. C.; PERALTA, R.; PAIVA, T.; BENTES, C. 24-Hour Rhythmicity of Seizures in Refractory Focal Epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 55, p. 75–78, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.005>>.

OHTA, H.; YAMAZAKI, S.; MCMAHON, D. G. Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. **Nature Neuroscience**, 2005.

PANDA, S.; ANTOCH, M. P.; MILLER, B. H.; SU, A. I.; SCHOOK, A. B.; STRAUME, M.; SCHULTZ, P. G.; KAY, S. A.; TAKAHASHI, J. S.; HOGENESCH, J. B. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. **Cell**, 2002.

PARENT, J. M.; KRON, M. M. Neurogenesis and epilepsy. **Epilepsia**, 2010.

PARTCH, C.; GREEN, C.; TAKAHASHI, J. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. **Trends in cell biology**, v. 24, n. 2, p. 90–99, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096289241300113X>>.

PATEL, M.; LIANG, L. P.; ROBERTS, L. J. Enhanced hippocampal F2-isoprostane formation following kainate-induced seizures. **Journal of Neurochemistry**, 2001.

PETKOVA, Z.; TCHEKALAROVA, J.; PECHLIVANOVA, D.; MOYANOVA, S.; KORTENSKA, L.; MITREVA, R.; POPOV, D.; MARKOVA, P.; LOZANOV, V.;

ATANASOVA, D.; LAZAROV, N.; STOYNEV, A. Treatment with melatonin after status epilepticus attenuates seizure activity and neuronal damage but does not prevent the disturbance in diurnal rhythms and behavioral alterations in spontaneously hypertensive rats in kainate model of temporal lobe epile. **Epilepsy and Behavior**, 2014.

PITKÄNEN, A.; LUKASIUK, K.; DUDEK, F. E.; STALEY, K. J. Epileptogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 10, p. 1–17, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26385090>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4588129>>.

PITSCH, J.; BECKER, A. J.; SCHOCH, S.; MÜLLER, J. A.; DE CURTIS, M.; GNATKOVSKY, V. Circadian clustering of spontaneous epileptic seizures emerges after pilocarpine-induced status epilepticus. **Epilepsia**, 2017.

POLIDAROVÁ, L.; SLÁDEK, M.; SOTÁK, M.; PÁCHA, J.; SUMOVÁ, A. Hepatic, duodenal, and colonic circadian clocks differ in their persistence under conditions of constant light and in their entrainment by restricted feeding. **Chronobiology International**, 2011.

PUTTACHARY, S.; SHARMA, S.; STARK, S.; THIPPESWAMY, T. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. **BioMed Research International**, 2015. .

QIN, B.; DENG, Y. Overexpression of circadian clock protein cryptochrome (CRY) 1 alleviates sleep deprivation-induced vascular inflammation in a mouse model. **Immunology Letters**, 2015.

QUIGG, M. Circadian rhythms: Interactions with seizures and epilepsy. **Epilepsy Research**, 2000.

QUIGG, M.; CLAYBURN, H.; STRAUME, M.; MENAKER, M.; BERTRAM, E. H. Effects of circadian regulation and rest-activity state on spontaneous seizures in a rat model of limbic epilepsy. **Epilepsia**, 2000.

QUIGG, M.; STRAUME, M.; MENAKER, M.; BERTRAM, E. H. Temporal distribution of partial seizures: comparison of an animal model with human partial epilepsy. **Annals of neurology**, 1998.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, 1972.

RIBAK, C. E.; SHAPIRO, L. A.; YAN, X.-X.; DASHTIPOUR, K.; NADLER, J. V.; OBENAU, A.; SPIGELMAN, I.; BUCKMASTER, P. S. Seizure-induced formation of basal dendrites on granule cells of the rodent dentate gyrus. **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**, 2012.

ROWLEY, S.; LIANG, L. P.; FULTON, R.; SHIMIZU, T.; DAY, B.; PATEL, M. Mitochondrial respiration deficits driven by reactive oxygen species in experimental temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, 2015.

ROWLEY, S.; PATEL, M. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 121–131, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.002>>.

SCHAPPEL, G. J.; BERAN, R. G.; KENNAWAY, D. L.; MCLOUGHNEY, J.; MATTHEWS, C. D. Melatonin Response in Active Epilepsy. **Epilepsia**, 1995.

SCHEFFER, I. E.; BERKOVIC, S.; CAPOVILLA, G.; CONNOLLY, M. B.; FRENCH, J.; GUILHOTO, L.; HIRSCH, E.; JAIN, S.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.; NORDLI, D. R.; PERUCCA, E.; TOMSON, T.; WIEBE, S.; ZHANG, Y. H.; ZUBERI, S. M. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 512–521, 2017.

SIMON, N.; PAPA, K.; VIDAL, J.; BOULAMERY, A.; BRUGUEROLLE, B. Circadian rhythms of oxidative phosphorylation: Effects of rotenone and melatonin on isolated rat brain mitochondria. **Chronobiology International**, 2003.

SISODIYA, S. Etiology and management of refractory epilepsies. **Nature Clinical Practice Neurology**, 2007. .

STEINHÄUSER, C.; GRUNNET, M.; CARMIGNOTO, G. Crucial role of astrocytes in temporal lobe epilepsy. **Neuroscience**, 2015.

STEWART, L. S.; LEUNG, L. S. Temporal lobe seizures alter the amplitude and timing of rat behavioral rhythms. **Epilepsy and Behavior**, 2003.

STRANGE, B. A.; WITTER, M. P.; LEIN, E. S.; MOSER, E. I. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 655–669, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn3785>>.

STRATMANN, M.; SCHIBLER, U. Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. **Journal of Biological Rhythms**, 2006. .

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

TCHEKALAROVA, J.; MOYANOVA, S.; DE FUSCO, A.; NGOMBA, R. T. **The role of the melatonergic system in epilepsy and comorbid psychiatric disorders** **Brain**

**Research Bulletin**, 2015. .

TCHEKALAROVA, J.; PECHLIVANOVA, D.; ITZEV, D.; LAZAROV, N.; MARKOVA, P.; STOYNEV, 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**, 2010.

TUREK, F. W. Staying off the dance floor: when no rhythm is better than bad rhythm. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 2008.

VACCAREZZA, M. M.; SILVA, W. H. **Dietary therapy is not the best option for refractory nonsurgical epilepsy** *Epilepsia*, 2015. .

VAN LOO, K. M. J.; SCHAUB, C.; PITSCH, J.; KULBIDA, R.; OPITZ, T.; EKSTEIN, D.; DALAL, A.; URBACH, H.; BECK, H.; YAARI, Y.; SCHOCH, S.; BECKER, A. J. Zinc regulates a key transcriptional pathway for epileptogenesis via metal-regulatory transcription factor 1. **Nature Communications**, 2015.

VAN NIEUWENHUYSE, B.; RAEDT, R.; SPRENGERS, M.; DAUWE, I.; GADEYNE, S.; CARRETTE, E.; DELBEKE, J.; WADMAN, W. J.; BOON, P.; VONCK, K. The systemic kainic acid rat model of temporal lobe epilepsy: Long-term EEG monitoring. **Brain Research**, 2015.

VARVEL, N. H.; JIANG, J.; DINGLELINE, R. Candidate Drug Targets for Prevention or Modification of Epilepsy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 2015.

VIDENOVIC, A.; LAZAR, A. S.; BARKER, R. A.; OVEREEM, S. “The clocks that time us” - Circadian rhythms in neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 12, p. 683–693, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.206>>.

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

WIEBE, S.; BLUME, W. T.; GIRVIN, J. P.; ELIASZIW, M. A Randomized, Controlled Trial of Surgery for Temporal-Lobe Epilepsy. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 5, p. 311–318, 2001. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200108023450501>>.

WILLIAMS, P. A.; WHITE, A. M.; CLARK, S.; FERRARO, D. J.; SWIERCZ, W.; STALEY, K. J.; DUDEK, F. E. Development of spontaneous recurrent seizures after kainate-induced status epilepticus. **The Journal of neuroscience**, 2009.

YANG, L.; CHU, Y.; WANG, L.; WANG, Y.; ZHAO, X.; HE, W.; ZHANG, P.; YANG, X.; LIU, X.; TIAN, L.; LI, B.; DONG, S.; GAO, C. Overexpression of CRY1 protects against the development of atherosclerosis via the TLR/NF- $\kappa$ B pathway. **International Immunopharmacology**, 2015.

YEGNANARAYAN, R.; MAHESH, S. D.; SANGLE, S. Chronotherapeutic dose schedule of phenytoin and carbamazepine in epileptic patients. **Chronobiology International**, 2006.

ZSURKA, G.; KUNZ, W. S. **Mitochondrial dysfunction and seizures: The neuronal energy crisis** *The Lancet Neurology*, 2015.

## **Anexos**

RESEARCH ARTICLE

## Genetic susceptibility in Juvenile Myoclonic Epilepsy: Systematic review of genetic association studies

Bruna Priscila dos Santos<sup>1</sup>, Chiara Rachel Maciel Marinho<sup>1</sup>, Thalita Ewellyn Batista Sales Marques<sup>1</sup>, Layanne Kelly Gomes Angelo<sup>1</sup>, Máisa Vieira da Silva Malta<sup>1</sup>, Marcelo Duzzioni<sup>2</sup>, Olagide Wagner de Castro<sup>3</sup>, João Pereira Leite<sup>4</sup>, Fabiano Timbó Barbosa<sup>5</sup>, Daniel Leite Góes Gitai<sup>1\*</sup>

**1** Department of Cellular and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil, **2** Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil, **3** Department of Physiology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil, **4** Division of Neurology, Department of Neurosciences and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **5** School of Medicine, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil

\* [danielgitai@gmail.com](mailto:danielgitai@gmail.com)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Santos BPd, Marinho CRM, Marques TEBS, Angelo LKG, Malta MVdS, Duzzioni M, et al. (2017) Genetic susceptibility in Juvenile Myoclonic Epilepsy: Systematic review of genetic association studies. PLoS ONE 12(6): e0179629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179629>

**Editor:** Klaus Brusgaard, Odense University Hospital, DENMARK

**Received:** September 9, 2016

**Accepted:** June 1, 2017

**Published:** June 21, 2017

**Copyright:** © 2017 Santos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number: 484911/2012-0, DLG, JPL; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), DLG, TEBSM; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), TEBSM. The funders had no role in study design, data collection and

### Abstract

#### Background

Several genetic association investigations have been performed over the last three decades to identify variants underlying Juvenile Myoclonic Epilepsy (JME). Here, we evaluate the accumulating findings and provide an updated perspective of these studies.

#### Methodology

A systematic literature search was conducted using the PubMed, Embase, Scopus, Lilacs, epiGAD, Google Scholar and Sigle up to February 12, 2016. The quality of the included studies was assessed by a score and classified as low and high quality. Beyond outcome measures, information was extracted on the setting for each study, characteristics of population samples and polymorphisms.

#### Results

Fifty studies met eligibility criteria and were used for data extraction. With a single exception, all studies used a candidate gene approach, providing data on 229 polymorphisms in or near 55 different genes. Of variants investigating in independent data sets, only rs2029461 SNP in GRM4, rs3743123 in CX36 and rs3918149 in BRD2 showed a significant association with JME in at least two different background populations. The lack of consistent associations might be due to variations in experimental design and/or limitations of the approach.

RESEARCH ARTICLE

# Identification of microRNAs with Dysregulated Expression in Status Epilepticus Induced Epileptogenesis

Mykaella Andrade de Araújo<sup>1</sup>, Thalita Ewellyn Batista Sales Marques<sup>1</sup>, Shirley Octacílio-Silva<sup>2</sup>, Carmem Lúcia de Arroxelas-Silva<sup>1</sup>, Marília Gabriella Alves Goulart Pereira<sup>3</sup>, José Eduardo Peixoto-Santos<sup>4</sup>, Ludmyla Kandratavicius<sup>4</sup>, João Pereira Leite<sup>4</sup>, Norberto Garcia-Cairasco<sup>5</sup>, Olagide Wagner Castro<sup>6</sup>, Marcelo Duzzioni<sup>6</sup>, Geraldo Aleixo Passos<sup>7</sup>, Maria Luisa Paçó-Larson<sup>8</sup>, Daniel Leite Góes Gitai<sup>1\*</sup>



CrossMark  
click for updates

**1** Department of Cellular and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil, **2** Department of Morphology, Health and Biological Sciences Center, Federal University of Sergipe, Aracajú, Sergipe, Brazil, **3** Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Alagoas, Alagoas, Minas Gerais, Brazil, **4** Division of Neurology, Department of Neurosciences and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **5** Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **6** Department of Physiology and Pharmacology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil, **7** Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **8** Department of Cellular and Molecular Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

\* [danielgitai@gmail.com](mailto:danielgitai@gmail.com)

**OPEN ACCESS**

**Citation:** Araújo MA, Marques TE, Octacílio-Silva S, Arroxelas-Silva CL, Pereira MG, Peixoto-Santos JE, et al. (2016) Identification of microRNAs with Dysregulated Expression in Status Epilepticus Induced Epileptogenesis. PLoS ONE 11(10): e0163855. doi:10.1371/journal.pone.0163855

**Editor:** Partha Mukhopadhyay, National Institutes of Health, UNITED STATES

**Received:** April 29, 2016

**Accepted:** September 15, 2016

**Published:** October 3, 2016

**Copyright:** © 2016 Araújo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All Microarray data are available from the ArrayExpress database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) under accession number E-MEXP-4633.

**Funding:** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number: 484911/2012-0; DLG, JPL, NGC, MLP; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), DLG, TEBSM; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MAA, TEBSM;

## Abstract

The involvement of miRNA in mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) pathogenesis has increasingly become a focus of epigenetic studies. Despite advances, the number of known miRNAs with a consistent expression response during epileptogenesis is still small. Addressing this situation requires additional miRNA profiling studies coupled to detailed individual expression analyses. Here, we perform a miRNA microarray analysis of the hippocampus of Wistar rats 24 hours after intra-hippocampal pilocarpine-induced Status Epilepticus (H-PILO SE). We identified 73 miRNAs that undergo significant changes, of which 36 were up-regulated and 37 were down-regulated. To validate, we selected 5 of these (10a-5p, 128a-3p, 196b-5p, 352 and 324-3p) for RT-qPCR analysis. Our results confirmed that miR-352 and 196b-5p levels were significantly higher and miR-128a-3p levels were significantly lower in the hippocampus of H-PILO SE rats. We also evaluated whether the 3 miRNAs show a dysregulated hippocampal expression at three time periods (0h, 24h and chronic phase) after systemic pilocarpine-induced status epilepticus (S-PILO SE). We demonstrate that miR-128a-3p transcripts are significantly reduced at all time points compared to the naïve group. Moreover, miR-196b-5p was significantly higher only at 24h post-SE, while miR-352 transcripts were significantly up-regulated after 24h and in chronic phase (epileptic) rats. Finally, when we compared hippocampi of epileptic and non-epileptic humans, we observed that transcript levels of miRNAs show similar trends to the animal models. In summary, we successfully identified two novel dysregulated miRNAs (196b-5p

RESEARCH ARTICLE

# Diurnal Variation Has Effect on Differential Gene Expression Analysis in the Hippocampus of the Pilocarpine-Induced Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy

Evelin Antonieli da Silva Santos<sup>1</sup>, Thalita Ewellyn Batista Sales Marques<sup>1</sup>, Heloísa de Carvalho Matos<sup>1</sup>, João Pereira Leite<sup>2</sup>, Norberto Garcia-Cairasco<sup>3</sup>, Maria Luisa Paçó-Larson<sup>4</sup>, Daniel Leite Góes Gitai<sup>1\*</sup>

**1** Department of Cellular and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil, **2** Department of Neurology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **3** Department of Physiology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **4** Department of Cellular and Molecular Biology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

\* [danielgitai@gmail.com](mailto:danielgitai@gmail.com)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Santos EAdS, Marques TEBS, Matos HdC, Leite JP, Garcia-Cairasco N, Paçó-Larson ML, et al. (2015) Diurnal Variation Has Effect on Differential Gene Expression Analysis in the Hippocampus of the Pilocarpine-Induced Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. PLoS ONE 10(10): e0141121. doi:10.1371/journal.pone.0141121

**Editor:** Giuseppe Biagini, University of Modena and Reggio Emilia, ITALY

**Received:** March 19, 2015

**Accepted:** October 5, 2015

**Published:** October 16, 2015

**Copyright:** © 2015 Santos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number: 484911/2012-0, to DLGG; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) to DLGG; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (EASS and TEBSM received scholarship 23038.007934/2010); and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

## Abstract

The molecular mechanisms underlying epileptogenesis have been widely investigated by differential gene expression approach, especially RT-qPCR methodology. However, controversial findings highlight the occurrence of unpredictable sources of variance in the experimental designs. Here, we investigated if diurnal rhythms of transcript's levels may impact on differential gene expression analysis in hippocampus of rats with experimental epilepsy. For this, we have selected six core clock genes (*Per1*, *Per3*, *Bmal1*, *Clock*, *Cry1* and *Cry2*), whose rhythmic expression pattern in hippocampus had been previously reported. Initially, we identified *Tubb2a/Rplp1* and *Tubb2a/Ppia* as suitable normalizers for circadian studies in hippocampus of rats maintained to 12:12 hour light:dark (LD) cycle. Next, we confirmed the temporal profiling of *Per1*, *Per3*, *Bmal1*, *Cry1* and *Cry2* mRNA levels in the hippocampus of naive rats by both Acrophase and CircWave statistical tests for circadian analysis. Finally, we showed that temporal differences of sampling can change experimental results for *Per1*, *Per3*, *Bmal1*, *Cry1* and *Cry2*, but not for *Clock*, which was consistently decreased in rats with epilepsy in all comparison to the naive group. In conclusion, our study demonstrates it is mandatory to consider diurnal oscillations, in order to avoid erroneous conclusions in gene expression analysis in hippocampus of rats with epilepsy. Investigators, therefore, should be aware that genes with circadian expression could be out of phase in different animals of experimental and control groups. Moreover, our results indicate that a sub-expression of *Clock* may be involved in epileptogenicity, although the functional significance of this remains to be investigated.