

Hiago Murilo de Melo

**NÍVEIS DE BIOMARCADORES DE PLASTICIDADE
SINÁPTICA EM ESTRUTURAS DO SISTEMA LÍMBICO
HUMANO ESTÃO ASSOCIADOS À MANUTENÇÃO DO
TÔNUS CARDÍACO VAGAL DE REPOUSO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Roger Walz

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Melo, Hiago Murilo

Níveis de biomarcadores de plasticidade sináptica em estruturas do sistema límbico humano estão associados à manutenção do tônus cardíaco vagal de repouso / Hiago Murilo Melo ; orientador, Roger Walz, 2018.

101 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Sistema Nervoso Autônomo. 3. Plasticidade Sináptica. 4. Sistema Límbico. 5. Variabilidade da Frequência Cardíaca. I. Walz, Roger. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

Hiago Murilo de Melo

**NÍVEIS DE BIOMARCADORES DE PLASTICIDADE
SINÁPTICA EM ESTRUTURAS DO SISTEMA LÍMBICO
HUMANO ESTÃO ASSOCIADOS À MANUTENÇÃO DO
TÔNUS CARDÍACO VAGAL DE REPOUSO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Florianópolis, 30 de outubro de 2018.

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Roger Walz, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rodrigo Bainy Leal, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus familiares, pacientes, colegas de laboratório e professores que possibilitaram a realização desta pesquisa com excelência.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e suporte durante todas as etapas de execução deste trabalho, inclusive pelo incentivo para continuar minha formação acadêmica. Em especial a minha mãe, Nísia Ramos, por mesmo sem entender muito bem o que é variabilidade da frequência cardíaca ou fosforilação, sempre reconheceu minha paixão por fazer ciência e forneceu todas as condições para que eu pudesse me dedicar integralmente as atividades acadêmicas. Ao meu Pai, Sérgio Murilo de Melo, que forneceu suporte durante este período. Aos meus padrinhos, Clóvis e Stella, por sempre estarem ao meu lado durante esta caminhada e fornecerem momentos de descontração essenciais para recuperar minha energias e poder retomar os experimentos.

Durante o período da graduação em psicologia, agradeço às professoras das disciplinas de neuroanatomia, fisiologia e histologia, Profa. Dra. Rosane Porto Seleme, Profa. Dra. Mariana Graciela Terenzi e Profa. Dra. Eliane Maria Goldfeder respectivamente, por terem me apresentado o sistema nervoso e ter despertado minha paixão pela psicobiologia. Ao Prof. Dr. Rogério Ferreira Guerra, professor de psicofisiologia, por ter me apresentado com meus primeiros livros sobre método experimental e neurociência quando o procurei com o desejo de me tornar um cientista. Em especial, agradeço o Prof. Dr. Emílio Takase por ter aberto as portas do Laboratório de Educação Cerebral (LEC) e dado início a minha formação como cientista. Ao longo dos 6 anos que trabalhei sob sua supervisão tive o prazer de participar de congressos, experimentos, oficinas, SEPEX, dentre muitas outras atividades que trazem incontáveis memórias boas e muito aprendizado sobre neurociência, psicofisiologia experimental e eletrofisiologia. Graças aos seus puxões de orelha e horas de supervisão pude aprender muito durante todo este período, inclusive foi ele que me apresentou a Variabilidade da Frequência Cardíaca que é tema deste trabalho, muito obrigado por tudo! Aos colegas do LEC, em especial ao Lucas Martins do Nascimento e Diego Schmaedech, agradeço pelo auxílio e apoio no desenvolvimento de artigos científicos e tecnologias, graças as nossas parcerias conseguimos concretizar muitas das nossas ideias!

Durante o período de pós-graduação em neurociências, agradeço aos colegas de laboratório Alexandre Ademar Hoeller, Douglas Affonso Formolo, Cristiane Ribeiro de Carvalho por terem me ensinado tudo o que eu sei sobre pesquisa em modelo animal, muito obrigado por toda a paciência, ensinamentos e horas de supervisão, tudo o que eu aprendi com vocês foi essencial para minha formação como cientista e sempre

levarei seus ensinamentos comigo. Em especial, tenho muito para agradecer ao meu supervisor de mestrado Prof. Dr. Roger Walz. Além de ter aberto as portas de seu laboratório e ter fornecido acesso aos dados que dão origem a este trabalho o Prof. Roger é motivo de inspiração pela sua paixão e dedicação em fazer ciência, mais do que isso seu incentivo para apoiar ideias inovadoras é fundamental para a formação de um cientista. Antes que eu esqueça, muito obrigado por todos os momentos bem-humorados que ajudaram a encarar melhor os resultados negativos e principalmente por todas as dicas que ajudaram meus artigos a “passarem da secretária”, nunca esquecerei dos teus ensinamentos! Agradeço também aos colegas Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal e Dr. Mark Williams pela contribuição no processo de análise bioquímica.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências (PPGNeuro) da Universidade Federal de Santa Catarina que possibilitou a execução desta dissertação de mestrado e também forneceu disciplinas, estrutura e professores excelentes que tiveram um impacto significativo em minha como cientista. Em especial, agradeço ao servidor aposentado Nivaldo Manoel Vicente, ao coordenador do PPGNeuro Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos e ao vice coordenador do PPGNeuro Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira pelo esforço incansável em garantir recurso e estrutura para todos os docentes e discentes do PPGNeuro.

Por fim, agradeço a FAPESC, CAPES e CNPq pelo financiamento desta pesquisa e pela minha bolsa de modalidade CAPES/DS que possibilitou a dedicação exclusiva para a realização desta pesquisa.

“O quê? Não dá certo? Você já tentou resolver pelo menos de 99 formas diferentes? Não? Então só volte aqui quando conseguir colocar em prática ao menos 10 soluções diferentes! Se eu for aí e resolver nem precisa voltar amanhã”.

(Emílio Takase, 2012)

RESUMO

Emoções são mecanismos de adaptação psicofisiológicos que possibilitam a mobilização de múltiplos subsistemas para regular a homeostase do organismo em prol da adaptação ao contexto. O sistema nervoso autônomo (SNA) tem um papel central na produção de respostas emocionais que ajustam o equilíbrio homeostático para responder de forma mais eficiente a relação entre demandas internas e externas do organismo devido sua extensa rede sináptica com nervos, órgãos e sensores biológicos distribuídos ao longo do organismo. O modelo integrativo neurovisceral propõe que o tônus autonômico cardíaco em repouso é influenciado pelo processo adequado de inibição da amígdala pelas sinapses GABAérgicas do córtex pré-frontal, indicando que os sinais de segurança do contexto foram reconhecidos como inibidores das respostas de luta ou fuga e que esta resposta autonômica adaptativa pode ser avaliada por meio dos índices da variabilidade da frequência cardíaca (VFC). O objetivo deste trabalho é verificar se há associação entre os níveis de biomarcadores de plasticidade sináptica na amígdala (AMI) e no hipocampo anterior (HIPa) humano e a VFC avaliada em repouso. As amostras de tecido cerebral foram coletadas de 18 pacientes submetidos à cirurgia de epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose no hipocampo (ELTM-EH). Os registros de eletrocardiograma foram obtidos após o despertar da primeira manhã da internação para realização da avaliação pré-cirúrgica por vídeo-eletroencefalograma. Os níveis da subunidade GluA1 do receptor de Glutamato do tipo AMPA e sua fosforilação nos resíduos de serina 831 e 845 da subunidade GluA1 dos receptores AMPA (P-GluA1-Ser31e P-GluA1-Ser845, respectivamente) no HIPa e da AMI foram analisados por Western blot. Como indicadores da VFC foram analisados os índices: a) desvio padrão das médias de todos os intervalos R-R (SDNN); b) raiz quadrada da média do quadrado das diferença entre intervalos R-R adjacentes (rMSSD); c) componente de alta frequência (0,15-0,4Hz) (HF). Para determinar a existência de associação independente entre os biomarcadores neuroquímicos e os índices de VFC foram realizadas regressões lineares múltiplas utilizando o método *stepwise backward*, controlando a distribuição das variáveis clínicas, demográficas e bioquímicas dos pacientes. Os modelos finais de regressão linear múltipla mostraram uma associação negativa entre os níveis de fosforilação P-GluA1-Ser845 na AMI e no HIPa e o tempo de doença que prediz 52% a 61% da variação do tônus autonômico cardíaco, enquanto apenas o P-GluA1-Ser845 na AMI ou no HIPa estão

associados a variação de 23% a 38% dos índices da VFC (SDNN, rMSSD e HF). Os resultados deste trabalho indicam que o aumento da eficiência sináptica na AMI ou HIPa está associado a redução na VFC, fornecendo a primeira evidência bioquímica de relação entre alterações de plasticidade sináptica no sistema límbico humano e a manutenção do tônus autonômico cardíaco. Por fim, este trabalho suporta o modelo de integração neurovisceral, sugerindo que o aumento da eficiência sináptica da AMI refletida pela fosforilação do resíduo de serina 845 na subunidade GluA1 dos receptores AMPA está associado a redução da VFC possivelmente por dificultar o processo de inibição da AMI por parte do córtex pré-frontal.

Palavras-chave: Variabilidade da Frequência Cardíaca. Sistema Límbico. Plasticidade Sináptica.

ABSTRACT

Emotional responses are psychophysiological mechanisms that enable the mobilization of multiple subsystems to regulate the organism's homeostasis to optimize contextual adaptation. The autonomic nervous system (ANS) has a key role in the control of internal and external demands of the body for establishing homeostasis due to its extensive synaptic network with nerves, organs and biological sensors distributed throughout the body. The neurovisceral integrative model proposes that resting cardiac autonomic tone results in the proper process of amygdala inhibition by GABAergic synapses from the prefrontal cortex, indicating that the safety stimuli were recognized to inhibit the fight or flight responses and that this autonomic response can be assessed by heart rate variability (HRV) indices. This study aims to verify if there is an association between the levels of biomarkers of synaptic plasticity in the amygdala (AMI) and in the anterior hippocampus (HIPa) and the resting HRV. The brain tissue samples were collected from 18 patients with mesial temporal lobe epilepsy surgery associated with hippocampal sclerosis (ELTM-EH). The electrocardiogram records were obtained after the first morning of the hospitalization to perform the pre-surgical evaluation by video-electroencephalogram. The GluA1 subunit levels of the AMPA-type Glutamate receptor and their phosphorylation on serine 831 (P-GluA1-Ser31) and 845 (P-GluA1-Ser845) on HIPa and AMI were analyzed by Western blot analysis. The standard deviation of the means of all R-R intervals (SDNN), the square root of the square mean of the difference between adjacent R-R intervals (rMSSD) and the high frequency component (0.15-0.4 Hz) (HF) were analyzed as indicators of HRV. To determine the independent association between the neurochemical biomarkers and the HRV indices, multiple linear regressions were performed using the stepwise backward method for control the distribution of the clinical, demographic and biochemical variables of the patients. The final multiple linear regression models showed a negative association between P-GluA1-Ser845 phosphorylation levels in AMI and HIPa and disease time could predict 52% to 61% of HRV indices (SDNN, rMSSD, and HF) variation, while models including only the P-GluA1-Ser845 (AMI or HIPa) is associated with a variation of 23% to 38% of the HRV. The results indicate that increased synaptic efficiency in AMI or HIPa is associated with a reduction in HRV, providing the first biochemical evidence of the relationship between changes in synaptic plasticity in the human limbic system and the maintenance of cardiac autonomic tone. Finally, this

work supports the neurovisceral integration model, suggesting that increasing the synaptic efficiency of AMI via phosphorylation of GluA1 in serine 845 is associated with a reduction in HRV, possibly for impairing the process of inhibition of AMI by the prefrontal cortex, suggesting that HRV is a noninvasive marker of the relationship between central and autonomic nervous systems.

Keywords: Heart Rate Variability. Limbic System. Synaptic Plasticity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes modelos teóricos sobre o processo de produção de respostas emocionais (Adaptado de DALGLEISH, 2004).....	29
Figura 2 - Representação esquemática de alguns dos mecanismos bioquímicos associados ao processo de inibição e excitação do NSA por meio das sinapses do SNS e SNP (Adaptado de MCCORRY, 2007)...	33
Figura 3 - Sinal elétrico representativo da sequência de despolarizações e repolarizações atrioventriculares obtido por meio do registro de eletrocardiograma (Adaptado de VANDERLEI <i>et al.</i> , 2009).	34
Figura 4 - Sequência de um sinal de eletrocardiograma representando a identificação dos intervalos R-R (Adaptado de VANDERLEI <i>et al.</i> , 2009)	35
Figura 5 - Representação esquemática de algumas vias de controle do tônus cardíaco simpático por meio de sinapses do sistema nervoso central (Adaptado de THAYER; LANE, 2009).	40
Figura 6 - Representação esquemática de alguns dos mecanismos bioquímicos associados ao processo LTP (adaptado de BEAR <i>et al.</i> , 2004).	43
Figura 7 - Representação esquemática de alguns dos mecanismos bioquímicos associados ao processo LTD (adaptado de BEAR <i>et al.</i> , 2004).	44
Figura 8 - Efeito da fosforilação da subunidade GluA1 dos AMPARs nos sítios Ser831 e Ser845 no processo de plasticidade sináptica (adaptado de LEE <i>et al.</i> , 2000).....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Comparação entre as características morfofuncionais do sistema nervoso simpático e parassimpático (Adaptado de MCCORRY, 2007).	31
Quadro 2 - Descrição das características de domínio, fórmula matemática e origem fisiológica dos índices da variabilidade da frequência cardíaca (Adaptado de VANDERLEI <i>et al.</i> , 2009 e LABORDE <i>et al.</i> , 2017).....	36
Quadro 3 - Descrição dos testes estatísticos utilizados como pressupostos para atribuir confiabilidade ao modelo de regressão final.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Marcadores bioquímicos de plasticidade sináptica (P-GluA1-Ser831, P-GluA1-Ser845, GluA1 e GFAP) na AMI, HIPa e NTM associados ao tônus cardíaco vagal mensurado por meio da VFC.	56
Tabela 2 - Resultados da análise univariada para avaliar a associação das variáveis clínicas, demográficas e dos parâmetros intraoperativos na manutenção do tônus autonômico cardíaco mensurado por meio da VFC.	62
Tabela 3 - Modelos finais de regressão múltipla para o Ln (SDNN), Ln (rMSSD) e Ln (HF) as variáveis clínicas e marcadores de neuroplasticidade independentemente associados ao tônus cardíaco vagal avaliado através dos índices da VFC.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AC - Adenilato Ciclase
AD - Adrenalina
AEDs - Drogas Antiepilépticas, do inglês *Anti-Epileptic Drugs*
ACh – Acetilcolina
AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
AMPARs - Receptores AMPA
AMI - Amígdala
AMPc - 3',5' - monofosfato cíclico de adenosina
ATP - trifosfato de adenosina
CAM - Concentração Alveolar Mínima
CaMKII - Proteína cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina
CPF - Córtex Pré-Frontal
CVLM - Medula Caudal Ventrolateral, do inglês *Caudal Ventrolateral Medulla*
DSM - Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*
DO - Densidade Óptica
ECG - Eletrocardiograma
EEG - Eletroencefalograma
EH - Esclerose no Hipocampo
ELT - Epilepsia de Lobo Temporal
ELTM - Epilepsia de Lobo Temporal Mesial
ELTM-EH - Epilepsia de Lobo Temporal Mesial com Esclerose no Hipocampo
GFAP - Proteína ácida fibrilar glial, do inglês *Glial Fibrillary Acidic Protein*
GluR - Receptor Glutamatérgico
GluA1 - Subunidade tipo 1 dos Receptores Ionotrópicos de Glutamato do tipo AMPA
HF - Componente de alta frequência da VFC, do inglês *High Frequency*
HIP - Hipocampo
HIPa - Hipocampo anterior em humanos
HIPd - Hipocampo dorsal em roedores
HIPp - Hipocampo posterior em humanos
HIPv - Hipocampo ventral em roedores
HU-UFSC - Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina
ILAE - Liga Internacional Contra a Epilepsia, do inglês *International League Against Epilepsy*

LF - Componente de baixa frequência da VFC, do inglês *Low Frequency*

LF/HF - Razão entre os componentes LF e HF

LN - Logarítmicos Naturais

LTA - Lobectomia temporal anterior

LTD - Depressão de Longa Duração, do inglês *Long-term Depression*

LTM - Lobectomia temporal mesial

LTP - Potenciação de longa duração, do inglês *Long-term Potentiation*

MS - Milissegundos

NMDA - N-metil-D-aspartato

NMDARs - Receptores glutamatérgicos do tipo NMDA

NA - Noradrenalina

NIM - Modelo de integração neurovisceral, do inglês *Neurovisceral Integration Model*

NTM - Neocórtex Temporal Médio

NSA - Nodo Sinoatrial

P-GluA1-Ser831 - Porcentagem de GluA1 fosforilado no sítio serina 831

P-GluA1-Ser845 - Porcentagem de GluA1 fosforilado no sítio serina 845

pNN50 - Porcentagem de intervalos R-R adjacentes com diferença de duração maior que 50ms

PKA - Proteína cinase dependente de AMPc

PKC - Proteína cinase dependente de Ca^{2+}

PP1 - Proteína fosfatase 1, do inglês *Protein Phosphatase 1*

R-R - Intervalo R-R, tempo de duração medido em milissegundos entre um batimento cardíaco e outro

CAN - Rede de Controle Autônomo Central, do inglês *Central Autonomic Network*

rMSSD - Raiz quadrada da média do quadrado das diferença entre intervalos R-R adjacentes

RVLM - Medula Rostral Ventrolateral, do inglês *Rostral Ventrolateral Medulla*

RR Médio - Valor médio de todos os intervalos R-R

SDNN - Desvio padrão das médias de todos os intervalos R-R

SN - Sistema nervoso

SNA - Sistema nervoso autônomo

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso parassimpático

SNS - Sistema nervoso simpático

SUDEP - Morte por razão inesperada, do inglês *Sudden Unexpected Death*

SUS - Sistema único de saúde

VFC - Variabilidade da Frequência Cardíaca

WB - *Western blot*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMICO E RESPOSTAS EMOCIONAIS.....	30
1.2 MENSURANDO O TONUS CARDÍACO AUTÔNOMICO POR MEIO DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	34
1.3 CONTROLE DO TONUS AUTÔNOMICO CARDÍACO POR MEIO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	38
1.4 MECANISMOS DE NEUROPLASTICIDADE DO SISTEMA LÍMBICO.....	41
1.5 JUSTIFICATIVA.....	46
1.6 OBJETIVOS.....	47
1.6.1 Objetivo geral	47
1.6.2 Objetivos específicos	47
2 MÉTODO	49
2.1 PARTICIPANTES.....	49
2.2 REGISTRO FISIOLÓGICO.....	49
2.3 PROTOCOLO DE ANESTESIA NO MOMENTO DA CIRURGIA E COLETA DAS AMOSTRAS DE TECIDO CEREBRAL.....	51
2.4 CIRURGIA, VARIÁVEIS INTRAOPERATÓRIAS E AMOSTRAGEM DE TECIDO CEREBRAL.....	51
2.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	52
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1 OS ÍNDICES DA VFC ESTÃO ASSOCIADOS AOS NÍVEIS DOS BIOMARCADORES DE NEUROPLASTICIDADE NO HIPOCAMPO ANTERIOR E NA AMIGDALA, MAS NÃO NO NEOCÓRTEX TEMPORAL MÉDIO.....	57
3.2 ASSOCIAÇÕES ENTRE OS ÍNDICES DA VFC E AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES...	58
3.3 OS NÍVEIS DE P-GLUA1-SER-845 NO HIPOCAMPO ANTERIOR E AMIGDALA SÃO MARCADORES	

INDEPENDENTES DA VARIAÇÃO DO TÔNUS AUTONÔMICO CARDÍACO	67
3.4 OS NÍVEIS DE P-GLUA-SER845 TANTO NA AMI COMO NO HIPa SÃO PREDITORES DA VFC.....	71
3.5 A RELAÇÃO ENTRE A NEUROPLASTICIDADE NO SISTEMA LÍMBICO E TÔNUS AUTONÔMICO CARDÍACO NA ADAPTAÇÃO À EVENTOS ESTRESSORES	72
3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
4 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE A – Parecer do comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UFSC	93
APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	96
APÊNDICE C – Questionário de variáveis clínicas e operatórias..	99
ANEXO A – Escala de ansiedade e depressão hospitalar.....	101

1 INTRODUÇÃO

Emoções representam tendências de respostas psicofisiológicas para um estímulo ambiental específico que permitem a mobilização rápida de sistemas de adaptação para responder ou enfrentar um evento em virtude de um comportamento guiado por objetivo (DAMASIO, 1998; FRIJDA, 1988; THAYER; LANE, 2000). A ativação destes mecanismos adaptativos durante a execução de respostas emocionais que, em geral, envolvem dimensões comportamentais (por exemplo, expressões faciais) e fisiológicas (por exemplo, respostas autonômicas) para regular o equilíbrio homeostático do organismo em prol da otimização do desempenho (EKMAN, 1992; EKMAN *et al.*, 1992; LEVENSON, 2014, 1988, 1994). O marco inicial dos estudos sobre como expressamos nossas emoções foi o livro “A expressão das emoções em homens e animais” (do inglês, “*The Expression of the Emotions in Man and Animals*”) (DARWIN, 1872). Nesta obra foram apresentadas comparações de ilustrações de seres humanos e outros animais durante a exibição de diversas respostas emocionais sugerindo que, mesmo em diferentes espécies, algumas das manifestações comportamentais das emoções podem apresentar certa similaridade entre as espécies. Estas foram as primeiras evidências da existência de um conjunto de respostas emocionais preservadas ao longo da evolução, que possivelmente teriam a função de fornecer um conjunto de estratégias gerais de resposta a desafios e problemas comuns às espécies que colaboram para a adaptação dos organismos (TOOBY; COSMIDES, 1990). Por estarem relacionadas a características adaptativas os estudos seguintes buscaram modelos para compreender o processo de evocação das emoções (DALGLEISH, 2004).

O primeiro modelo que discutiu a evocação de uma resposta emocional foi publicado no manuscrito “O que é uma emoção?” (do inglês “*What is an emotion?*”) (JAMES, 1884). Este modelo, que ficou conhecido como “Teoria da Emoção de James-Lang”, propunha que um estímulo emocional produz respostas fisiológicas diretas e os comportamentos emocionais seriam resultado da percepção do indivíduo em relação a estas mudanças fisiológicas. Embora este modelo apresentasse uma explicação lógica sobre como produzimos nossas emoções, há situações em que as reações fisiológicas são vivenciadas mesmo sem a presença de uma emoção (por exemplo, a taquicardia ao praticar uma atividade física). Baseando-se nesta premissa, o modelo “James-Lang” foi criticado por meio do manuscrito “A teoria James-Lang das Emoções: Uma exame crítico e uma teoria alternativa” (do

inglês “*The James-Lange-theory of emotions: A critical examination and an alternative theory*” (CANNON, 1927). Neste novo modelo, conhecido como a “Teoria da Emoção de Cannon-Bard”, as respostas fisiológicas e comportamentais eram evocadas de forma simultânea durante a presença de um estímulo emocional, sugerindo que uma resposta emocional era composta do conjunto dos sistemas comportamentais e fisiológicos. Embora as teorias discordem sobre a ordem dos processos relacionados a manifestação de uma resposta emocional, ambos consideram que as emoções são respostas adaptativas e possuem componentes comportamentais e fisiológicos (CANNON, 1927; JAMES, 1884).

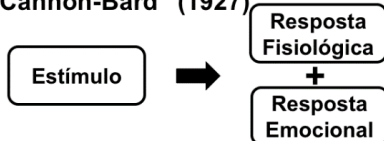
Os modelos de resposta emocional mais recentes, denominados modelos cognitivos, indicam que a evocação de emoções é resultado de um controles cognitivos antecedentes (como experiências anteriores ou estratégias cognitivas) que modulam a ativação, intensidade e duração das respostas emocionais (SCHACHTER; SINGER, 1962). Destes, o modelo com maior suporte de evidências científicas é a “Teoria da Avaliação da Emoção” (LAZARUS, 1982; SMITH; LAZARUS, 1993). Neste modelo, a sequência de eventos decorrentes da produção de uma resposta emocional tem início com a percepção de um estímulo emocional, este, é seguido de uma avaliação cognitiva que compara seus recursos disponíveis com os riscos e benefícios potenciais da situação. Uma vez que esta avaliação é realizada, as respostas fisiológicas e comportamentais mais adequadas são recrutadas para promover a adaptação do indivíduo a situação. Quando comparado aos modelos anteriores (Figura 1), os modelos cognitivos são os primeiros a considerar que as respostas emocionais podem ser reguladas por processos de controle cognitivo (por exemplo, planejamento, controle inibitório e flexibilidade cognitiva) e experiências prévias (GROSS, 1998, 2015; OCHSNER; GROSS, 2005), indo ao encontro dos modelos de controle emocional propostos por evidências do sistema nervoso (conforme descrito por THAYER; LANE, 2000, 2009).

Figura 1 - Diferentes modelos teóricos sobre o processo de produção de respostas emocionais (Adaptado de DALGLEISH, 2004).

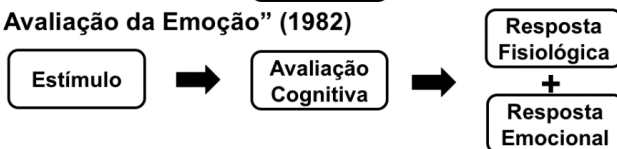
“Teoria de James-Lang” (1884)



“Teoria de Cannon-Bard” (1927)



“Teoria da Avaliação da Emoção” (1982)



Desde as primeiras investigações sobre emoções, o envolvimento do sistema nervoso autônomo (SNA) sempre esteve presente nas teorias sobre respostas emocionais, provavelmente devido seu papel na produção, expressão e reconhecimento das emoções (CANNON, 1927; DALGLEISH, 2004; EKMAN *et al.*, 1992; EKMAN; LEVENSON; FRIESEN, 1983; JAMES, 1884; LEVENSON, 1988) e sua contribuição na manutenção da homeostase do organismo (MCCORRY, 2007). Além de suas características fisiológicas, a atividade do SNA pode ser quantificada a partir de registros eletrofisiológicos bem descritos na literatura, fornecendo evidências pouco suscetíveis à manipulação voluntária do indivíduo avaliado, reduzindo os possíveis vieses de aferição e interpretação do pesquisador como pode ocorrer na avaliação de manifestações comportamentais (por exemplo, julgamento de intensidade de expressões faciais), tornando o método robusto para explorar respostas emocionais (KREIBIG, 2010; LEVENSON, 2014). Atualmente, as investigações sobre respostas emocionais autônomicas se concentram em duas principais áreas: a) Estudos sobre coerência cujo objetivo é avaliar os processos do sistema nervoso central responsáveis por sincronizar o SNA para produzir emoções e b) Estudos sobre Especificidade que tem como objetivo avaliar os padrões específicos de atividade do SNA associados a expressão de cada emoção (LEVENSON, 2014). Neste sentido, este trabalho contribui para compreender os mecanismos do sistema nervoso central (SNC)

associados a produção de respostas autonômicas, mais especificamente a relação entre mecanismos de plasticidade sináptica no sistema límbico humano e a manutenção do tônus autonômico cardíaco de repouso.

1.1 SISTEMA NERVOSO AUTONÔMICO E RESPOSTAS EMOCIONAIS

As respostas emocionais mudam momento-a-momento de acordo com a situação ambiental atual e a experiência prévia do indivíduo, tornando-se um processo autorregulado já que indivíduos podem influenciar quais emoções estão sentido, quando eles vão sentir e principalmente como eles sentem e expressam estas respostas, otimizando sua flexibilidade individual para se adaptar a eventos de maior complexidade (GROSS, 1998, 2015). O SNA possui um papel crítico para as respostas emocionais, fornecendo suporte metabólico para uma ação adaptativa, produzindo sinais corporais aparentes para sinalizar a valência emocional da situação e gerando sensações viscerais que colaboram na elaboração da experiência subjetiva das emoções (LEVENSON, 2003). Para promover adaptação, o SNA sincroniza a atividade de vários órgãos (por exemplo, coração, pupila ou bexiga) para ajustar o equilíbrio homeostático em prol de otimizar o desempenho do organismo frente a situação (MAUSS *et al.*, 2005).

De forma geral, o SNA tem um papel central no estabelecimento do equilíbrio homeostático entre as demandas internas e externas do organismo devido sua extensa rede sináptica com nervos, órgãos e sensores biológicos distribuídos ao longo do corpo (EKMAN; LEVENSON; FRIESEN, 1983; KREIBIG, 2010; LEVENSON, 2014; MCCORRY, 2007). Mais especificadamente, existem ao menos quatro funções principais realizadas pelo SNA: i) Regulação (realizar ajustes fisiológicos para promover a manutenção da homeostase); ii) Ativação (alterar o equilíbrio da homeostase a curto prazo para promover a adaptação do organismo para demandas específicas); iii) Coordenação (administrar vias de informações aferentes e eferentes para produzir respostas emocionais); e iv) Comunicação (promover alterações visíveis no organismo para sinalizar os efeitos de um determinado estímulo ambiental aos demais organismos) (LEVENSON, 2014).

Para realizar estas quatro funções o SNA possui subdivisões denominadas “Sistema Nervoso Simpático” (SNS) e “Sistema Nervoso Parassimpático” (SNP) cujas características (descritas em detalhes no Quadro 1) são capazes de produzir diferentes padrões de atividade para evocar respostas emocionais compatíveis com as demandas ambientais

(MCCORRY, 2007). De forma geral, o controle do SNS sobre os órgãos está envolvido com a produção de respostas comportamentais para mobilização de energia (por exemplo, suas sinapses no coração promovem taquicardia), enquanto o SNP atua na inibição dos processos fisiológicos para promover um estado de recuperação de energia (por exemplo, suas sinapses no coração promovem bradicardia). A relação de “ativação e inibição” não é generalizada para todos os órgãos inervados pelo SNA, já que as sinapses do SNP são responsáveis pelo aumento da atividade das glândulas salivares ou da atividade visceral (por exemplo estômago ou intestino). Embora a atividade do SNP para estes órgãos seja excitatória, geralmente ela é observada quando o organismo está em repouso, por este motivo o SNP está majoritariamente associado a processos de recuperação de energia (LEVENSON, 2014; MCCORRY, 2007).

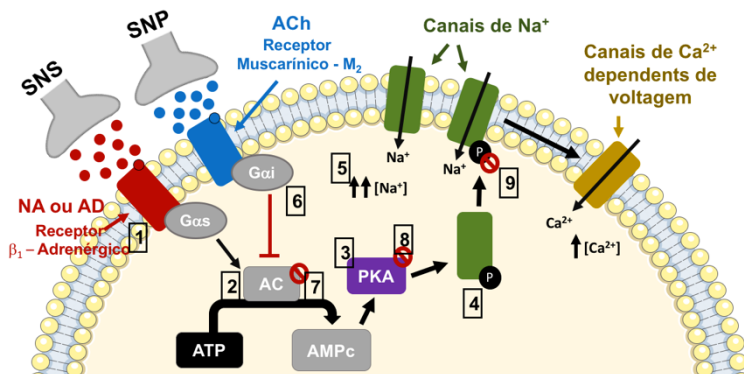
Quadro 1 - Comparação entre as características morfofuncionais do sistema nervoso simpático e parassimpático (Adaptado de MCCORRY, 2007).

Características	SNS	SNP
Fibras pré-ganglionares	Curta	Longa
Fibras pós-ganglionares	Longa	Curta
Origem dos nervos	Região torácica e lombar da medula espinal (T ₁ -L ₂)	Região cervical (nervos cranianos III, VII, IX e X) e sacral da medula espinal (S ₂ -S ₄)
Receptores pré-ganglionares (Neurotransmissor)	Nicotínicos (Acetilcolina)	Nicotínicos (Acetilcolina)
Receptores pós-ganglionares (Neurotransmissor)	Adrenérgicos (Adrenalina)	Muscarínicos (Acetilcolina)
Atividade regulatória	Provoca uma atividade intensa que geralmente mobiliza mais de um órgão	Provoca uma atividade específica que geralmente mobiliza apenas um órgão
Correlatos comportamentais	Geralmente relacionado a respostas comportamentais de mobilização de energia, como por	Geralmente relacionado a respostas comportamentais de recuperação de energia, como por exemplo, repouso após

	exemplo, respostas de luta ou fuga	a ingestão de alimentos
--	---------------------------------------	----------------------------

No caso do controle autonômico cardíaco, os neurônios do nodo sinoatrial (NSA) recebem sinapses simultâneas do SNS e do SNP, onde cada um dos eixos do SNA exerce a função de excitatória e inibitória, respectivamente (Figura 2). A influência das sinapses excitatórias do SNS no NSA ocorre por meio da interação da entre a adrenalina e noradrenalina liberada pelos neurônios do SNS e os receptores β_1 – adrenérgicos do NSA. Os receptores β_1 – adrenérgicos são receptores acoplados à proteína G_s (1), que uma vez ativado estimula a adenilato-ciclase (AC)(2) que promovem níveis o 3',5' monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) que ativam a proteína cinase A dependente de AMPC (PKA)(3). A PKA fosforila canais de Na^+ (4), que quando acoplados a membrana permitem um maior influxo de Na^+ (5) no meio intracelular, facilitando a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. A facilitação no processo de despolarização dos neurônios aumenta a frequência de despolarização do NSA, conseqüentemente elevando a frequência cardíaca (ECKER *et al.*, 2006; NETO; RASCADO; BENDHACK, 2006). O processo de inibição do NSA por meio do SNP ocorre por meio da interação entre a acetilcolina e os receptores muscarínicos do tipo M_2 do NSA. Os receptores muscarínicos M_2 são receptores metabotrópicos acoplados à proteína G_i (6) cuja ativação leva à inibição da AC(7), sem a atividade da AC os níveis de AMPC se tornam baixos e a PKA é inibida(8). Sem a fosforilação da PKA nos canais de Na^+ o influxo de Na^+ na membrana celular diminui e o neurônio tende a se hiperpolarizar(9), dificultando o processo de despolarização dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e conseqüentemente reduzindo a frequência de despolarização do NSA (diminuindo a frequência cardíaca) (DHEIN; VAN KOPPEN; BRODDE, 2001).

Figura 2 - Representação esquemática de alguns dos mecanismos bioquímicos associados ao processo de inibição e excitação do NSA por meio das sinapses do SNS e SNP (Adaptado de MCCORRY, 2007).



Legenda: AC, adenilato-ciclase; ATP, adenosite tri-fosfato; AMPc, 3-5 monofosfato de adenosina; PKA, proteína cinase dependente de AMPc; NA, noradrenalina; AD, adrenalina; Ach, acetilcolina; SNS, sistema nervoso simpático; SNP, sistema nervoso parassimpático.

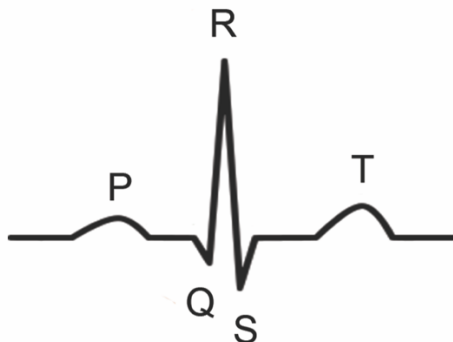
Durante uma resposta emocional são recrutados múltiplos sistemas adaptativos do organismo, geralmente envolvendo sinais comportamentais (por exemplo, produção de expressões faciais) e fisiológicos (por exemplo, alterações autonômicas), fazendo com que as características e intensidade das respostas desses sistemas adaptativos recrutados sejam uma forma de quantificar e classificar as emoções (EKMAN, 1992; EKMAN; LEVENSON; FRIESEN, 1983; LEVENSON, 2014, 1988; MAUSS *et al.*, 2005). Dentre os diversos órgãos que recebem sinapses autonômicas o coração é o mais investigado, tendo o maior número de publicações relacionadas (KREIBIG, 2010). O controle do tônus autonômico cardíaco destaca-se por apresentar: a) inervações simpáticas e parassimpáticas (permite uma maior variação de padrões de atividade autonômica) (LABORDE; MOSLEY; THAYER, 2017; LEVENSON, 2014; MCCORRY, 2007; VANDERLEI *et al.*, 2009), b) evidências robustas para diferentes padrões de resposta emocional (EKMAN; LEVENSON; FRIESEN, 1983; KREIBIG, 2010), c) atividade eletrofisiológica facilmente registrada por meio de equipamentos como o eletrocardiograma (ECG) (VANDERLEI *et al.*, 2008, 2009) e d) métodos de análise quantitativa bem descritos na literatura (como os índices de variabilidade da frequência cardíaca obtida por meio dos intervalos R-R) (TASK

FORCE, 1996; KREIBIG, 2010; THAYER; LANE, 2000; VANDERLEI *et al.*, 2009).

1.2 MENSURANDO O TONUS CARDÍACO AUTÔNOMICO POR MEIO DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

O registro da atividade elétrica do coração é um método de investigação do sistema cardiovascular com valor diagnóstico e prognóstico acessado por meio do ECG sendo uma técnica não-invasiva de baixo custo de grande utilidade clínica (RIBEIRO *et al.*, 2013). O sinal elétrico registrado pelo ECG é resultado da sequência de despolarizações e repolarizações atrioventriculares originadas no NSA (VANDERLEI *et al.*, 2009). A composição do sinal de ECG observado (Figura 3) é derivada da soma dos dipolos elétricos gerados a cada uma das etapas do batimento cardíaco, sendo representados pelas ondas “P”, complexo “QRS” e “T” que representam respectivamente a despolarização do átrio, despolarização do ventrículo (em conjunto da repolarização do átrio) e repolarização ventricular respectivamente (SZTAJZEL, 2004).

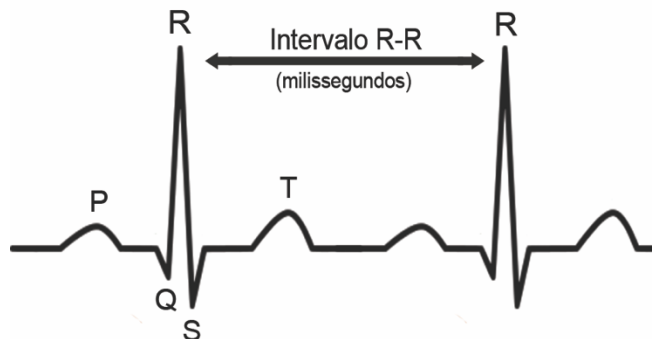
Figura 3 - Sinal elétrico representativo da sequência de despolarizações e repolarizações atrioventriculares obtido por meio do registro de eletrocardiograma (Adaptado de VANDERLEI *et al.*, 2009).



A Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) é calculada a partir de índices quantitativos originados pelo intervalo de tempo, medido em milissegundos (ms), entre um batimento cardíaco e outro (Figura 4) (TASK FORCE, 1996; LABORDE; MOSLEY; THAYER, 2017; LOPES *et al.*, 2014; VANDERLEI *et al.*, 2009). Dentre as diversas ondas que compõem o ECG o pico “R” é o mais utilizado para a

extração deste intervalo de tempo, sendo assim, a extração dos intervalos de tempo que originam os índices de VFC geralmente ocorre por meio da distância entre os intervalos R-R mensurados em milissegundos (Figura 4) (TASK FORCE, 1996).

Figura 4 - Sequência de um sinal de eletrocardiograma representando a identificação dos intervalos R-R (Adaptado de VANDERLEI *et al.*, 2009)



A variação dos intervalos R-R é influenciada pelo ritmo respiratório, pressão arterial e sistema nervoso autônomo (TASK FORCE, 1996; LEVY, 1971; VANDERLEI *et al.*, 2009). Conforme discutido anteriormente na Sessão 1.1, a influência do SNS no controle autônomo é mediada pela liberação de adrenalina e noradrenalina dos gânglios simpáticos que, quando ligada aos receptores β_1 – adrenérgicos dos neurônios do NSA, ativam uma cascata bioquímica (Figura 2) que resulta na facilitação da despolarização diastólica (BROWN; DIFRANCESCO; NOBLE, 1979; DIFRANCESCO *et al.*, 1986; TRAUTWEIN; CAVALIÉ, 1985). A modulação da frequência cardíaca por meio das sinapses do SNP ocorre pela liberação de acetilcolina cuja ligação aos receptores muscarínicos do tipo M2 ativam uma cascata bioquímica (Figura 2) que facilita a hiperpolarização das células do nodo sinoatrial levando à lentificação da frequência cardíaca (DIFRANCESCO; TROMBA, 1988). Desta forma, a redução do intervalo de tempo entre os picos R-R está associada à atividade simpática (aumento da frequência cardíaca), enquanto o aumento do intervalo de tempo entre intervalos R-R está associado à atividade parassimpática (redução da frequência cardíaca) (TASK FORCE, 1996; SZTAJZEL, 2004; VANDERLEI *et al.*, 2009).

O controle da frequência cardíaca está sob influência tônica do sistema nervoso simpático cuja atividade é modulada por processos de

inibição colinérgica vagal, fazendo com que as alterações observadas na VFC sejam majoritariamente provocadas por processos inibitórios do SNP (THAYER; LANE, 2009). Esta complexa interação de predominância entre os dois eixos do SNA é responsável por alterações na VFC necessárias para a manutenção da homeostase do organismo em diferentes contextos (CHESS; TAM; CALARESU, 1975; TASK FORCE, 1996; LEVY, 1971). Os índices de quantificação da atividade do SNS e do SNP extraídos por meio da análise quantitativa da VFC são derivados de fórmulas matemáticas no domínio do tempo e da frequência, aplicadas aos intervalos R-R conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 - Descrição das características de domínio, fórmula matemática e origem fisiológica dos índices da variabilidade da frequência cardíaca (Adaptado de VANDERLEI *et al.*, 2009 e LABORDE *et al.*, 2017).

Índice (unidade)	Domínio	Descrição	Origem Fisiológica
RR Médio (ms)	Tempo	Valor médio de todos os intervalos R-R	Influência simpática e parassimpática mútua
SDNN (ms)	Tempo	Desvio padrão das médias de todos os intervalos R-R	Componentes Cíclicos responsáveis pela VFC
rMSSD (ms)	Tempo	Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos R-R adjacentes	Influência predominantemente parassimpática
pNN50 (%)	Tempo	Porcentagem de intervalos R-R adjacentes com diferença de duração maior que 50ms	Influência predominantemente parassimpática
LF(ms ²)	Frequência	Componente de Baixa Frequência (<i>Low Frequency</i>) (0,04 e 0,15Hz)	Influência simpática e parassimpática mútua
HF (ms ²)	Frequência	Componente de	Influência

		Alta Frequência (<i>High Frequency</i>) (0,15 e 0,4Hz)	predominantemente parassimpática
LF/HF (n)	Frequência	Razão entre os componentes LF e HF	Influência simpática e parassimpática mútua

Os índices do domínio do tempo são calculados através de métodos estatísticos tradicionais, como média, desvio padrão, dentre outros, aplicados aos valores dos intervalos R-R cujas derivações resultam nos índices: (a) RR médio; (b) SDNN; (c) rMSSD; e (d) pNN50 (TASK FORCE, 1996; LABORDE; MOSLEY; THAYER, 2017; VANDERLEI *et al.*, 2009). Já a quantificação dos índices no domínio da frequência envolvem o cálculo de densidade espectral, fornecendo a informação de como a densidade espectral de potência (por exemplo, variação ou área sob a curva) é distribuída em função de uma faixa de frequência específica, resultando nos índices: (a) LF (0,04-0,15Hz); (b) HF (0,15-0,4Hz); e (c) LF/HF (TASK FORCE, 1996; LABORDE; MOSLEY; THAYER, 2017; VANDERLEI *et al.*, 2009).

Há uma correlação entre os índices que representam o balanço autonômico no domínio do tempo e frequência (por exemplo, rMSSD e HF) cuja diferença está na método matemático para a obtenção dos valores quantitativos, mas também na sensibilidade e especificidade de cada domínio de acordo com o intervalo de tempo mensurado (TASK FORCE, 1996; NUSSINOVITCH *et al.*, 2011). Estudos recentes sugerem que medidas do domínio do tempo são mais fidedignas para registros com curta duração (< 5min), enquanto os índices no domínio da frequência requerem registros mais longos (entre 5 a 10min.) (ESCO; FLATT, 2014; FLATT; ESCO, 2013; MELO *et al.*, 2018; MUNOZ *et al.*, 2015; NAKAMURA *et al.*, 2015; NUSSINOVITCH *et al.*, 2011; THONG *et al.*, 2003).

De acordo com a teoria da avaliação da emoção (LAZARUS, 1982; SMITH; LAZARUS, 1993) o processo de produção de uma resposta emocional tem ao menos duas etapas que antecedem a ativação dos mecanismos psicofisiológicos adaptativos. A etapa de seleção de estímulos e a avaliação cognitiva que antecedem as respostas emocionais são determinantes para a evocação de respostas autonômicas, sendo assim, estruturas do SNC responsáveis pelo processamento sensorial e funções cognitivas superiores possuem um

papel importante na regulação das respostas autonômicas (ETKIN; BÜCHEL; GROSS, 2015; GROSS, 2015).

1.3 CONTROLE DO TONUS AUTONÔMICO CARDÍACO POR MEIO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O modelo de associação entre as funções de estruturas cerebrais e a produção de respostas emocionais mais aceito atualmente constitui a teoria do “Sistema Límbico” proposta por MacLean (MACLEAN, 1949). De acordo com este modelo, as estruturas cerebrais responsáveis pelo processamento emocional são categorizadas em três grupos com relações hierárquicas entre si: a) “sistema reptiliano”; b) “sistema límbico; e c) “sistema de mamífero moderno”. O primeiro, denominado “sistema reptiliano”, é responsável pelas emoções mais primitivas envolvidas com emoções essenciais para a sobrevivência (como medo ou agressividade), sendo constituído por estruturas do tronco encefálico. O segundo, denominado “sistema límbico”, é responsável pelas emoções sociais (como tristeza ou alegria), constituído pelas estruturas propostas por Papez (como tálamo, hipocampo e córtex cingulado) (PAPEZ, 1937), a amígdala e o córtex pré-frontal. Por fim, o “sistema de mamífero moderno” composto de estruturas neocorticais que exerce um papel de controle sob os outros dois circuitos. Sendo assim, o “sistema reptiliano” seria responsáveis por funções de manutenção do organismo, enquanto o “sistema límbico” seria o responsável pela produção das respostas emocionais, por fim o “sistema de mamífero moderno” atuaria no controle da atividade destes outros dois sistemas (CATANI; DELL’ACQUA; THIEBAUT DE SCHOTTEN, 2013; DALGLEISH, 2004; MACLEAN, 1949).

Como emoções são respostas psicofisiológicas de adaptação, a rede de neurônios do sistema límbico possui sinapses eferentes com sistemas comportamentais e fisiológicos para evocar a resposta emocional adequada ao estímulo emocional (LEVENSON, 2003, 2014; THAYER; LANE, 2000). Neste sentido, parte das estruturas do sistema límbico (como o córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo, córtex cingulado, hipotálamo, dentre outras regiões) integram a rede autonômica central (RAC) (BENARROCH, 1993; SHOEMAKER *et al.*, 2015; THAYER; LANE, 2000). O papel da RAC é integrar informações sensoriais para controlar respostas autonômicas, comportamentais e neuroendócrinas responsáveis pela adaptação da homeostase de acordo com as demandas contextuais (BENARROCH, 1993; THAYER; LANE, 2000). Devido à sobreposição de estruturas e circuitos com funções

associadas ao processamento emocional e às respostas autonômicas, os efeitos observados pela atividade do SNA podem ser usados, ao menos em parte, como indicadores de respostas emocionais (THAYER *et al.*, 2012; THAYER; LANE, 2000, 2009).

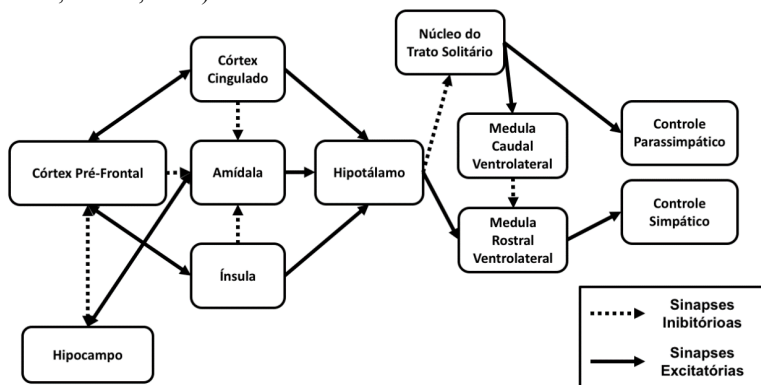
O modelo de integração neurovisceral (THAYER *et al.*, 2012; THAYER; LANE, 2000, 2009) propõe que durante a situação de repouso, ou em condições fisiológicas de neutralidade, a amígdala (AMI) esteja inibida tonicamente por sinapses GABAérgicas do córtex pré-frontal (CPF). Durante uma situação de incerteza, o CPF se torna hipoativo, promovendo uma redução da inibição da AMI que facilita o recrutamento dos circuitos simpatoexcitatórios para gerar uma resposta emocional de mobilização de energia (por exemplo, respostas de luta ou fuga). Os autores sugerem que o funcionamento adequado desta relação de inibição entre o CPF e AMI esteja relacionada com o processo de regulação emocional e conseqüentemente da VFC, pois a AMI participa da RAC (BENARROCH, 1993; SHOEMAKER *et al.*, 2015; THAYER; LANE, 2000) que por sua vez modula a frequência cardíaca. Embora o modelo dê ênfase no papel da relação de inibição entre CPF e AMI como principal mecanismo de controle autonômico da VFC, outras estruturas do sistema límbico também participam deste processo devido suas sinapses com a AMI, como é o caso das sinapses excitatórias do hipocampo (HIP) que também modulam a atividade da AMI e podem influenciar na eficiência do processo de inibição do CPF (MUJICA-PARODI *et al.*, 2009; SHOEMAKER *et al.*, 2015).

Neste modelo, a inibição adequada da AMI por meio das sinapses do CPF está relacionada a valores elevados dos índices mediados pelo SNP da VFC (como o rMSSD ou HF). Modificações nos índices mediados por SNP em geral são denominadas de “VFC”, pois o controle cardíaco recebe uma influência tônica do SNS para manter uma frequência cardíaca basal e a VFC é modulada majoritariamente pelas sinapses inibitórias do SNP (THAYER; LANE, 2000). Valores elevados de VFC indicam que o indivíduo consegue reconhecer os sinais de que o ambiente não apresenta ameaça e escolhe a resposta emocional adequada para o estado de repouso. Uma redução nos índices da VFC durante a condição de repouso representa a predominância das sinapses simpatoexcitatórias que reflete um prejuízo no processo de habituação já que uma resposta emocional inadequada está sendo selecionada naquele momento. Neste sentido, a relação funcional entre o CPF e AMI está associada ao processo de regulação emocional (ETKIN; BÜCHEL; GROSS, 2015) o qual repercute sobre o sistema nervoso periférico e,

consequentemente, pode ser avaliado de forma indireta por meio dos índices da VFC (THAYER; LANE, 2000, 2009).

A falha no processo de inibição da AMI por parte das sinapses do CPF acarreta no aumento da frequência cardíaca e redução da VFC por três vias principais (conforme ilustrado na Figura 5): (a) inibição dos neurônios da medula caudal ventrolateral (ou CVLM, do inglês *Caudal Ventrolateral Medulla*) que desinibe os neurônios simpatoexcitatórios da medula rostral ventrolateral (ou RVLM, do inglês *Rostral Ventrolateral Medulla*) (aumento de atividade simpática); (b) inibição dos neurônios do núcleo do trato solitário (diminuição da atividade parassimpática); ou (c) ativação direta dos neurônios da RVLM (aumento de atividade simpática) (BARBAS *et al.*, 2003; BENARROCH, 1993; SHEKHAR *et al.*, 2006; THAYER *et al.*, 2009). Devido à participação destas estruturas no processamento emocional e cognitivo, o modelo de integração neurovisceral sugere que a VFC seja regulada por processos fisiológicos, afetivos e cognitivos (HANSEN; JOHNSEN; THAYER, 2003; THAYER *et al.*, 2012; THAYER; BROSSCHOT, 2005; THAYER; LANE, 2000, 2009).

Figura 5 - Representação esquemática de algumas vias de controle do tônus cardíaco simpático por meio de sinapses do sistema nervoso central (Adaptado de THAYER; LANE, 2009).



A desregulação das sinapses inibitórias parassimpáticas do nervo vago provoca um predomínio da atividade simpática, que pode ser benéfica em momentos nos quais o organismo deve mobilizar suas respostas de “luta ou fuga”, porém a utilização contínua dessa estratégia de enfrentamento sem um período de recuperação adequado pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares

(THAYER *et al.*, 2009, 2012; THAYER; YAMAMOTO; BROSSCHOT, 2010). Devido a esta relação entre a manutenção do tônus vagal e a adaptabilidade do organismo ao ambiente em que está inserido, a redução nos índices da VFC é um indicativo má-adaptabilidade ao contexto (THAYER *et al.*, 2012; THAYER; LANE, 2000, 2009).

Corroborando o modelo neurovisceral integrativo, estudos clínicos sugerem que pacientes com distúrbios psiquiátricos (como por exemplo, diagnósticos de ansiedade ou depressão) apresentam uma redução nos índices da VFC durante a condição de repouso quando comparados ao grupo controle de indivíduos saudáveis (CHALMERS *et al.*, 2014; FRIEDMAN; THAYER, 1998; KEMP *et al.*, 2010, 2012) indicando que a desregulação emocional patológica está associada a disfunção autonômica. Além dos sintomas comportamentais, uma meta-análise de estudos com registro simultâneo de métodos de neuroimagem e VFC indicou que a AMI e o CPF juntamente com outras áreas corticais e subcorticais compõem um circuito associado à manutenção do tônus cardíaco de repouso (THAYER *et al.* 2012). Mais precisamente, Mujica-Parodi *et al.* (2009) demonstraram por ressonância nuclear magnética funcional que o efeito BOLD nas regiões da AMI e do HIP correlacionam-se negativamente com os índices de VFC no repouso. Além disso, Sakaki *et al.* (2016) mostraram que há uma relação funcional de conectividade (espessura axonal mensurada por tractografia) entre o CPF e a AMI a qual está associada a valores elevados da VFC, sugerindo que o controle da atividade da AMI está associada à manutenção da VFC. Evidências comportamentais e neuroanatômicas sugerem que os índices da VFC refletem a atividade do SNA e, consequentemente, um potencial biomarcador não-invasivo da regulação emocional (BEAUCHAINE; THAYER, 2015; LABORDE; MOSLEY; THAYER, 2017; THAYER *et al.*, 2009, 2012; THAYER; LANE, 2000). Neste sentido, modificações na neuroplasticidade em estruturas do sistema límbico poderiam estar associadas aos índices da VFC.

1.4 MECANISMOS DE NEUROPLASTICIDADE DO SISTEMA LÍMBICO

Estima-se que o cérebro humano possua cerca de 86 bilhões de neurônios e 84 bilhões de células gliais (AZEVEDO *et al.*, 2009). Grande parte da flexibilidade de comportamentos produzidos por nosso organismo ocorre devido a diversidade das formas de comunicação entre

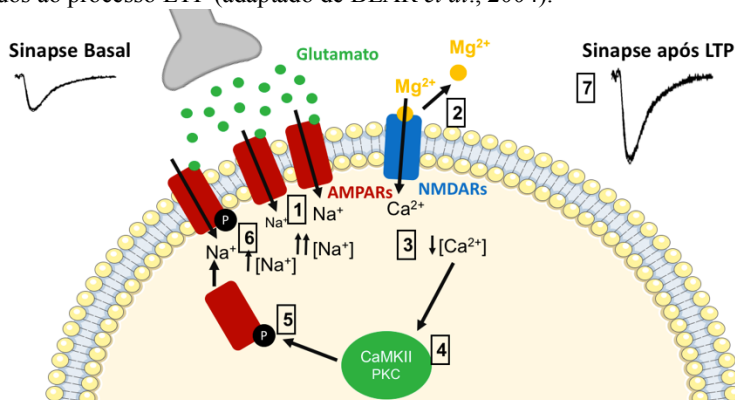
as células do sistema nervoso e suas redes especializadas, e suas adaptações decorrentes de estímulos ambientais, que caracterizam o processo denominado de neuroplasticidade (HAASE; LACERDA, 2004; RUGGIERO *et al.*, 2011; SHAFFER, 2016). Dentre as formas de adaptação do sistema nervoso por meio da influência ambiental, o aumento duradouro da transmissão sináptica de estruturas límbicas, conhecido como potenciação de longo prazo (ou LTP, do inglês, *Long-term Potentiation*), e a diminuição na eficácia sináptica, depressão de longo prazo (ou LTD, do inglês *Long-term Depression*), são mecanismos sinápticos de plasticidade relacionados ao aprendizado e memória (BEAR, 1996; BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; NABAVI *et al.*, 2014; RUGGIERO *et al.*, 2011; WHITLOCK *et al.*, 2006).

Os processos de LTP e LTD são, em geral, dependentes de neurotransmissão glutamatérgica, sendo observados experimentalmente quando estímulos elétricos de alta e baixa frequência são aplicados em uma população de neurônios. O glutamato liberado do neurônios pré-sináptico se liga aos receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) e NMDA (N-metil-D-aspartato). Os AMPARs são receptores ionotrópicos glutamatérgicos formados pela combinação dos conjuntos heterotetramétricos das subunidades GluA1, GluA2, GluA3 e GluA4. Os AMPARs existem em locais extra sinápticos e intracelulares, e podem ser recrutados para sinapses ativas durante o processo de plasticidade sináptica (HENLEY; WILKINSON, 2016). Estima-se que 80% das sinapses na região CA1 do hipocampo correspondem as heteromeros GluA1 e GluA2. O processo de recrutamento dos AMPARs durante o processo de LTP é dependente da fosforilação da subunidade GluA1 pela CaMKII, enquanto a retenção da LTP é dependente das subunidades GluA1 e GluA2 (HENLEY; WILKINSON, 2016; GREGER *et al.*, 2017). Os NMDARs, são formados pelas subunidades NR1, NR2 e NR3 e suas variações. Ele está envolvidos a diversos processos devido suas características específicas como o bloqueio do canal sensível a voltagem pelo Mg^{2+} extracelular e sua alta permeabilidade a Ca^{2+} (CULL-CANDY *et al.*, 2001). Os processos de LTP e LTD são dependentes dos NMDARs, pois sua permeabilidade a Ca^{2+} permitem a ativação de uma cascata bioquímica associada a plasticidade sináptica, conforme explicado nos próximos parágrafos.

Para produzir a LTP (Figura 6) é necessário um estímulo elétrico de alta frequência (100Hz) para liberar uma grande quantidade de glutamato na fenda sináptica. Destes, os primeiros a serem ativados são os receptores AMPA (AMPARs) acarretando o influxo de Na^+ para o meio intracelular(1). Este processo dá início ao processo de

despolarização celular que resulta na dissociação do íon de Mg^{2+} que bloqueia o canal do receptor NMDA (NMDARs)(2). Sem o bloqueio do Mg^{2+} os NMDARs permitem o influxo de Na^+ e Ca^{2+} (3). Como mensageiro intracelular, o Ca^{2+} promove a ativação de uma série de cinases. Dentre elas, a proteína cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII)(4) que atua na fosforilação dos AMPARs disponíveis no meio intracelular(5), sendo é responsável pelo aumento de AMPARs na membrana celular que reflete no maior influxo de Na^+ para o meio intracelular nas sinapses seguintes (6). Este mecanismo de plasticidade está associado ao aumento da eficiência sináptica(7) denominado LTP (BEAR, 1996; BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; NABAVI *et al.*, 2014; RUGGIERO *et al.*, 2011; WHITLOCK *et al.*, 2006).

Figura 6 - Representação esquemática de alguns dos mecanismos bioquímicos associados ao processo LTP (adaptado de BEAR *et al.*, 2004).

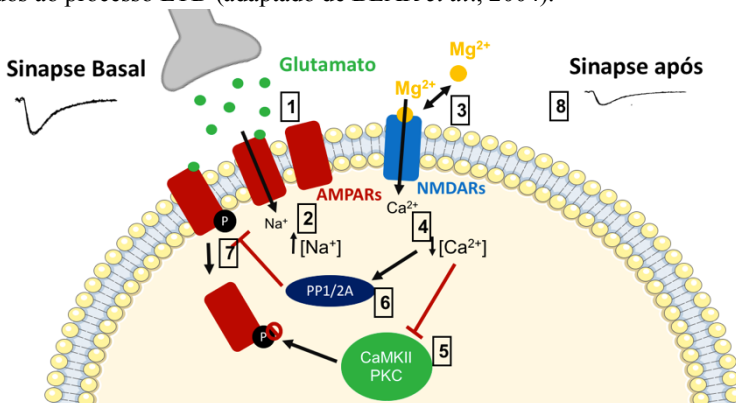


Legenda: AMPARs, receptores AMPA; NMDARs, receptores NMDA; CaMKII, proteínas cinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina; LTP, potenciação de longa duração; PKC, proteína cinase dependente de Ca^{2+} .

O processo de LTD (Figura 7) também é dependente de NMDARs, porém ocorre por meio de uma estimulação de baixa frequência (1 Hz). Ao receber a estimulação de baixa frequência a disponibilidade de neurotransmissores glutamatérgicos disponíveis na fenda sináptica diminui(1). A redução do influxo de Na^+ para o meio intracelular através dos AMPARs(2) prejudicando a atividade dos NMDARs pelo prejuízo no processo de bloqueio do íon de Mg^{2+} (3). A redução na atividade dos NMDARs acarreta na diminuição no influxo de Ca^{2+} no meio intracelular(4), reduzindo a atividade das CaMKII(5) e ativando a proteína fosfatase 1(6) (ou PP1, do inglês protein

phosphatase 1) que atua na desfosforilação dos AMPARs acoplados na membrana celular(7). A redução na atividade da CaMKII associada à desfosforilação dos AMPARs prejudicam o influxo de Na^+ nas sinapses seguintes, diminuindo a eficiência sináptica do neurônio(8) (BEAR, 1996; BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; NABAVI *et al.*, 2014; RUGGIERO *et al.*, 2011; WHITLOCK *et al.*, 2006). Portanto, o estado de fosforilação de sítios específicos dos AMPARs é um evento importante no mecanismo de regulação da neuroplasticidade tanto na LTP quanto na LTD.

Figura 7 - Representação esquemática de alguns dos mecanismos bioquímicos associados ao processo LTD (adaptado de BEAR *et al.*, 2004).

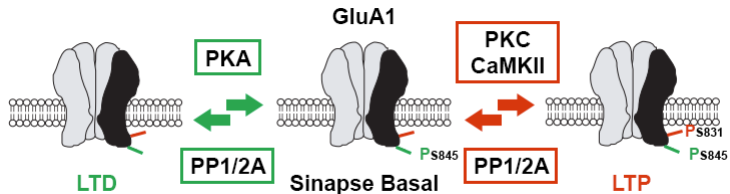


Legenda: AMPARs, receptores AMPA; CaMKII, proteínas cinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina; LTD, depressão de longa duração; PKC, proteína cinase dependente de Ca^{2+} ; PP1, proteína fosfatase do tipo 1; PP2A, proteína fosfatase do tipo 2A.

Dentre as diversas cascatas bioquímicas associadas ao processo de LTP (ler CHATER; GODA, 2014 para uma revisão completa), existem dois sítios principais da subunidade GluA1 dos AMPARs que regulam a condutância do canal e a inserção do receptor na membrana sináptica através dos seus estados de fosforilação e desfosforilação: (i) o sítio no resíduo de serina 831, fosforilado pela CaMKII (P-GluA1-Ser831) que aumenta a condutância do canal; (ii) e o sítio no resíduo de serina 845, fosforilado pela PKA (P-GluA1-Ser845) que afeta a probabilidade de canal aberto do receptor e regula a incorporação sináptica da subunidade GluA1 de AMPARs (HENLEY; WILKINSON, 2016; HUGANIR; NICOLL, 2013; LEE *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2014; WOOLFREY; DELL'ACQUA, 2015). Em sinapses saudáveis

(basais), a fosforilação de GluA1 no sítio Ser831 (sítio da CaMKII) facilita a LTP, enquanto a desfosforilação de Ser845 (sítio da PKA) via PP1/2A resulta em LTD (LEE *et al.*, 2000), conforme observado na Figura 8.

Figura 8 - Efeito da fosforilação da subunidade GluA1 dos AMPARs nos sítios Ser831 e Ser845 no processo de plasticidade sináptica (adaptado de LEE *et al.*, 2000).



Legenda: CaMKII, proteínas cinases dependentes de Ca²⁺/calmodulina; LTP, potenciação de longa duração; LTD, depressão de longa duração; PKA, proteínas cinases dependentes de AMPc; PKC, proteínas cinases dependentes de Ca²⁺; PP1, proteína fosfatase tipo 1; PP2A, proteína fosfatase tipo 2A; PS831, fosforilação do sítio serina 831; PS845, fosforilação do sítio serina 845.

A epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose do hipocampo (ELTM-EH) é o tipo de epilepsia refratária ao tratamento farmacológico mais prevalente no mundo, e a lobectomia temporal mesial (LTM) é uma modalidade de tratamento amplamente aceita para o controle das crises epilépticas e melhoria da qualidade de vida dos pacientes (FIEST; SAJOBI; WIEBE, 2014; PAULI *et al.*, 2017a; SPENCER, 2002; WIEBE *et al.*, 2001). Um estudo de meta-análise sobre VFC em pacientes com epilepsia (LOTUFO *et al.*, 2012), que revisou 39 estudos, mostrou que pacientes com epilepsia apresentam uma redução nos índices de VFC de repouso (como o rMSSD e HF) quando comparados a pacientes saudáveis ou com epilepsia bem controlada, sugerindo que as convulsões ocorrem e têm um papel fundamental na disfunção autonômica de pacientes com epilepsia. Alguns estudos sugerem que o prejuízo no tônus autonômico cardíaco avaliado por meio da VFC pode melhorar os métodos para a prevenção da morte súbita inesperada na epilepsia (SUDEP) (BAYSAL-KIRAC *et al.*, 2017; GALLI; LOMBARDI, 2017; LOTUFO *et al.*, 2012; RAUSCHER *et al.*, 2011; SURGES *et al.*, 2009b) podendo contribuir também para a avaliação da capacidade de regulação emocional devido à relação funcional comum das estruturas do lobo temporal mesial (como a AMI e HIP) às respostas emocionais (FANSELOW; DONG, 2010; KJELSTRUP *et al.*, 2002) e

controle autonômico (BENARROCH, 1993; THAYER *et al.*, 2009; THAYER; LANE, 2000), fornecendo insights sobre a maior prevalência psiquiátrica na epilepsia (GAITATZIS; TRIMBLE; SANDER, 2004) A ressecção do tecido cerebral por cirurgia de epilepsia uma oportunidade única para o estudo de estados de fosforilação em estruturas do sistema límbico humano (OSÓRIO *et al.*, 2017).

Em um estudo anterior, o grupo do Professor Dr. Roger Walz encontrou uma associação entre o medo ictal (aura de medo) e os níveis da amígdala da subunidade GluA1 dos receptores de glutamato e seu estado de fosforilação no HIPa estão relacionados ao medo ictal em pacientes com MTLE-HS, sugerindo que neuroplasticidade em estruturas do sistema límbico estão associadas aos circuitos de sobrevivência defensivos, podendo ter implicações para a compreensão sobre o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos e regulação emocional em humanos (LEAL *et al.*, 2018). A hipótese deste trabalho é de que o aumento da eficiência sináptica via fosforilação dos AMPARs em estruturas límbicas, como a AMI e HIPa, prejudicam a atividade inibitória de AMI e reduzem os índices de VFC mediados pelo SNP. Assim, este trabalho tem o objetivo de investigar a associação entre o estado de fosforilação da subunidade GluA1 AMPARs na AMI, HIPa e neocórtex temporal médio (NTM) e o tônus cardíaco vagal de repouso de pacientes com ELTM-EH tratados cirurgicamente.

1.5 JUSTIFICATIVA

Emoções representam respostas psicofisiológicas que permitem a flexibilidade do organismo para se adaptar a situações ambientais. O processo de regulação das emoções reflete o potencial do indivíduo para fornecer respostas adequadas de acordo com cada estímulo ambiental. O prejuízo no processo de regulação emocional, sendo pela escolha da resposta emocional inadequada ou pela falha no processo de inibição de uma emoção, está associado ao desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos. Dentre as formas de quantificar a influência autonômica sob a atividade cardíaca a variabilidade da frequência (VFC) cardíaca é um biomarcador não-invasivo, de baixo-custo e com métodos quantitativos bem estabelecidos para avaliar a influência dos eixos simpático e parassimpático no tônus autonômico cardíaco. O tônus autonômico cardíaco tem sem mostrado um marcador da capacidade individual de regulação emocional para fins de diagnóstico, mas os mecanismos envolvidos ainda são pouco compreendidos. Compreender os mecanismos envolvidos na variabilidade da frequência cardíaca pode

colaborar no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e prognóstico inovadores e de relação custo/benefício satisfatória pois: a) Alguns índices da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo (como o rMSSD) apresentam confiabilidade mesmo quando mensurados por um tempo curto (<1min.); b) Algoritmos de registro da variabilidade da frequência cardíaca por meio da câmera e flash de smartphones, reduzindo significativamente o custo de difusão da tecnologia no sistema único de saúde; e c) Processamento de sinal e análise quantitativa simples que permitem a adesão de profissionais da saúde. Desta forma, este trabalho contribui para compreender a os mecanismos envolvidos com a variabilidade da frequência cardíaca e a regulação emocional, fornecendo evidências para colaborar no processo de diagnóstico e prognósticos de pacientes com distúrbios relacionados a regulação emocional.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

Avaliar se há associação entre os níveis de marcadores de plasticidade sináptica no sistema límbico humano e a manutenção do tônus cardíaco vagal de repouso.

1.6.2 Objetivos específicos

- Investigar se há associação entre os marcadores bioquímicos de plasticidade sináptica (níveis de GluA1, P-GluA1-Ser831 e P-GluA1-Ser845) no sistema límbico (AMI, HIPa e NTM) e os índices da VFC (SDNN, rMSSD e HF);
- Verificar se há associação entre as características clínicas e demográficas dos pacientes com ELTM-EH e os índices da VFC (SDNN, rMSSD e HF);
- Desenvolver um modelo de regressão linear múltipla utilizando variáveis clínicas, demográficas e bioquímicas (níveis de GluA1, P-GluA1-Ser831 e P-GluA1-Ser845 na AMI, HIPa e NTM) capaz de prever a variação dos índices da VFC entre os pacientes com ELTM-EH (SDNN, rMSSD e HF).

2 MÉTODO

2.1 PARTICIPANTES

Dezoito pacientes adultos tratados cirurgicamente entre maio de 2009 e dezembro de 2012 no Centro de Epilepsia de Santa Catarina foram incluídos neste estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (365-FR304969) (Parecer disponível no “APÊNDICE A”). O termo de consentimento livre e esclarecido por escrito foi obtido de todos os participantes (“APÊNDICE B”). Todos apresentavam crises epiléticas com comprometimento da consciência ao menos uma vez por mês, apesar do tratamento adequado com drogas antiepiléticas (ou AEDs, do inglês Anti-Epileptic Drugs) (KWAN *et al.*, 2009). A anamnese, o exame neurológico, a avaliação psiquiátrica e neuropsicológica, a análise de vídeo-EEG de superfície e a ressonância magnética (RM, 1,5 Tesla) foram consistentes com o diagnóstico de ELTM-EH unilateral (ARAÚJO *et al.*, 2006; DE LEMOS ZINGANO *et al.*, 2015; GUARNIERI *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2011; PAULI *et al.*, 2017a, 2017b; VELASCO *et al.*, 2011; WIEBE *et al.*, 2001) As variáveis clínicas analisadas foram: a) idade (anos); b) duração da doença (anos); c) frequência mensal de crises epiléticas com comprometimento da consciência (crises disperceptivas); d) gênero (masculino ou feminino); e) lado da esclerose do hipocampo (direita ou esquerda); f) tipo tratamento farmacológico (monoterapia ou politerapia); g) uso de benzodiazepínicos como adjuvantes no tratamento da epilepsia (sim ou não); h) níveis séricos de fenobarbital e carbamazepina i) escores das escalas de ansiedade e depressão hospitalar (HADS) (DE LEMOS ZINGANO *et al.*, 2015; ZIGMOND; SNAITH, 1983).

2.2 REGISTRO FISIOLÓGICO

As gravações do eletrocardiograma (ECG) foram realizadas em posição supinada na manhã após a primeira noite de sono no hospital (entre 8 e 10 horas da manhã), cerca de 48h antes da neurocirurgia. Com exceção da suspensão do fenobarbital (meia vida longa) as doses dos demais fármacos antiepiléticos foram mantidos ao longo do dia e primeira noite de internação. Todas as gravações foram medidas continuamente durante 1 hora usando o sistema de vídeo-EEG Biologic® utilizando a taxa de amostragem de 512 Hz. As áreas em que os

eletrodos descartáveis de Ag/AgCl foram posicionados foi higienizada com álcool isopropílico (70%). Os eletrodos de eletrocardiograma foram colocados na configuração triangular do tórax. Para a análise da VFC, foram utilizados os primeiros 10 minutos de registro do ECG sem artefatos musculares e não precedidos de crises epiléticas no período que precedeu a coleta do sinal de eletrocardiograma para análise da VFC (inspeção visual pelo registro simultâneo de eletroencefalograma). A identificação do complexo QRS, a extração dos intervalos RR e a análise quantitativa da VFC foram realizadas no software Kubios v2.3 (TARVAINEN *et al.*, 2014).

A quantificação do tônus cardíaco vagal foi realizada por meio dos seguintes índices de VFC no domínio do tempo e da frequência: a) desvio padrão dos intervalos RR (SDNN); b) raiz quadrada das diferenças sucessivas (rMSSD); e c) alta frequência (0,15 Hz a 0,4 Hz). A escolha destes índices em específico se dá por três motivos: a) Representação clara da influência do sistema nervoso parassimpático na variação de cada índice (LABORDE; MOSLEY; THAYER, 2017), permitindo uma quantificação objetiva do tônus vagal sob a VFC; b) Estes são os índices comumente reportados em outros experimentos, permitindo a maior comparação dos resultados com outros experimentos (CHALMERS *et al.*, 2014; KEMP *et al.*, 2010; LOTUFO *et al.*, 2012; THAYER *et al.*, 2012); c) Por possuírem significado semelhante (como o rMSSD e o HF), mas serem extraídos por métodos quantitativos distintos permitem evitar o erro tipo I (“falso positivo”) já que a relação entre os índices terá que apresentar associação semelhante para confirmar a hipótese; d) Evitar a ocorrência do erro tipo I (“falso positivo”) em função de múltiplas comparações, como ao total são ao menos 13 índices da VFC obtidos por meio do domínio do tempo e frequência, a restrição do número de variáveis incluídas nas análises estatísticas para aquelas com significado semelhante diminui a chance de encontrar resultados em função do acaso. O domínio da frequência foi calculado pela Transformada Rápida de Fourier aplicando uma janela de Hanning de 256 s de largura com taxa de interpolação de 4 e uma sobreposição de 50%, seguindo os padrões do de análise do software Kubios v2.3 (TARVAINEN *et al.*, 2014). A extração de todos os índices de HRV foi realizada conforme previamente descrito em Task Force (1996). Os valores absolutos dos índices de VFC foram transformados em logaritmos naturais (\ln) para normalizar a amostra e minimizar os valores outliers (ABAD *et al.*, 2017; ESCO; FLATT, 2014; NAKAMURA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016), gerando os índices: a) \ln (SDNN), transformada logarítmica do índice SDNN; b)

Ln (rMSSD), transformada logarítmica do índice rMSSD; c) *Ln* (HF), transformada logarítmica do índice HF.

2.3 PROTOCOLO DE ANESTESIA NO MOMENTO DA CIRURGIA E COLETA DAS AMOSTRAS DE TECIDO CEREBRAL

O protocolo anestésico foi o mesmo para todos os pacientes (LOPES *et al.*, 2016). O protocolo deve início entre 7:30h e 8:30h da manhã com dose intravenosa de propofol (2 mg/kg, em bolus), fentanila (2 µg/kg, em bolus) e rocurônio (0,9 mg/kg, em bolus), e mantida com remifentanil por bomba de infusão (0,1 a 0,2 µg/kg/min) e isoflurano por inalação (0,5 a 0,6 CAM). A hidratação foi feita com solução salina isotônica (1,2 ml/kg / h) somando-se a metade do volume de diurese. A cefalotina (30 mg/kg) foi administrada 30 min antes da anestesia. A administração das AEDs por via oral foi mantida até o dia da cirurgia (por volta das 6h da manhã). Os pacientes receberam 20 mg/kg de fenitoína 12 horas antes da cirurgia e aqueles que estava sob efeito da fenitoína em casa receberam apenas a sua dose habitual oral no dia da cirurgia. Todos os pacientes receberam uma dose de fenitoína (5 mg/kg) após a coleta das amostras de tecido cerebral.

2.4 CIRURGIA, VARIÁVEIS INTRAOPERATÓRIAS E AMOSTRAGEM DE TECIDO CEREBRAL

As amostras analisadas do tecido cerebral foram removidas por uma lobectomia temporal anterior (LTA) padrão (WIEBE *et al.*, 2001) sem termo coagulação seguindo o modelo de coleta prospectivo recomendado (GRIZZLE; BELL; SEXTON, 2010) conforme descrito em trabalhos anteriores (LOPES *et al.*, 2016; RONSONI *et al.*, 2016). Uma amostra de 1 cm² do neocórtex temporal médio (NTM), localizada 3 cm posterior ao polo do lobo temporal, foi cuidadosamente dissecada da substância branca. Após o acesso à região temporal mesial, dois terços da AMI, incluindo seus núcleos basal e lateral, foram ressecados. Finalmente, a cabeça e o corpo do HIP foram removidos "em bloco" e o hipocampo anterior (HIPa) foi rapidamente dissecado em vidro refrigerado com gelo. Imediatamente após a coleta, as amostras foram transferidas para um tubo Eppendorf, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C para posterior análise. A duração da anestesia para coleta das amostras cerebrais foi controlada bem como outros parâmetros tais como: gasometria arterial, níveis séricos de eletrólitos, hematócrito/hemoglobina, pH, pressão arterial média,

frequência cardíaca e respiratória. Os parâmetros hemodinâmicos e respiratórios mantiveram-se estáveis durante todos os procedimentos e não houve complicações cirúrgicas.

2.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Todas as amostras foram homogeneizadas pelo mesmo pesquisador no mesmo dia e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise. Os níveis de fosforilação e a quantidade total de proteínas alvo foram determinados de maneira cega para todos os dados clínicos por Western Blot (WB), como descrito em trabalhos anteriores (LOPES *et al.*, 2012, 2016, 2013, 2015). Em resumo, as amostras de cérebro foram mecanicamente homogeneizadas em solução tampão contendo Tris 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na_3PO_4 2 mM, Triton X-100 a 1%, glicerol a 10%, coquetel inibidor de protease e centrifugado a 10.000 rpm a 4 durante 10 min. Os sobrenadantes foram diluídos em tampão de eletroforese. O conteúdo de proteínas foi estimado pelo método descrito por Peterson (PETERSON, 1977). As proteínas (60 μg por trilha) foram submetidas à eletroforese em eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose. As proteínas foram detectadas com os seguintes anticorpos seletivos: a) anti-total-GluA1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-13152); b) anti- fosfo-GluA1-Ser831 (Sigma-Aldrich, A4352); c) anti- fosfo-GluA1-Ser845 (Sigma-Aldrich, A4477); d) anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP, do inglês Glial Fibrillary Acidic Protein) (Cell Signaling, #3670) em uma diluição de 1:1000. Os Western blots foram desenvolvidos por reação quimioluminescente. Para controle de carga, todas as membranas foram incubadas com anticorpo anti- β -actina (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778, 1:2000). Os níveis de fosforilação foram determinados como uma proporção da densidade óptica (DO) da banda fosforilada em relação a DO da banda total. O imunoc conteúdo da proteína foi determinado como uma razão da DO da banda de proteínas para a DO da banda de β -actina (LOPES *et al.*, 2016). Devido à inexistência de amostras de tecido cerebral de controles saudáveis, um controle interno (IC) da amostra foi aplicado como referência em todas as eletroforeses. A amostra de referência foi obtida a partir de 3 amostras de HIP combinados preparados como todas as outras amostras. A razão DO (fosforilada/total ou total/ β -actina) para cada proteína alvo na amostra de referência foi considerada 100% e os dados foram expressos como variação percentual da amostra de referência (LOPES *et al.*, 2016). Da

análise foram extraídos: a) Níveis totais da subunidade GluA1; b) Níveis da subunidade GluA1 fosforilada no resíduo de serina 831 (P-GluA1-Ser831); c) Níveis da subunidade GluA1 fosforilada no resíduo de serina 845 (P-GluA1-Ser845); e d) Níveis de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), considerada um marcador de astrogliose.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis clínicas, demográficas e bioquímicas apresentaram distribuição normal por meio do teste *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,05$), enquanto os índices da VFC necessitaram de uma transformada logarítmica para obter uma distribuição normal. Foram realizadas análises univariadas inferenciais através dos testes *t* de *student* (para variáveis categóricas) e correlação de Pearson (para variáveis escalares) para avaliar a associação entre as variáveis clínicas, demográficas, bioquímicas com os índices da VFC (SDNN, rMSSD e HF). As variáveis que mostraram associação com $p < 0,10$ na análise univariada foram incluídas na análise de regressão linear múltipla. A análise de regressão linear múltipla foi realizada utilizando o método *backward stepwise*, que consiste no estabelecimento de um modelo inicial com todas as variáveis retirando aquelas que apresentam associação de $p > 0,10$ no conjunto das outras variáveis. Neste método, ao final do processo de retirada das variáveis independentes restam apenas aquelas que possuem maior associação preditiva com a variável dependente. Os modelos de regressão final múltipla considerados significativos foram aqueles que apresentaram $p < 0,05$ contendo apenas variáveis com $p < 0,10$ e seguindo os seguintes pressupostos (detalhes no Quadro 3): a) Heterocedasticidade; b) Multicolineariedade; c) Normalidade da distribuição dos resíduos; d) Ausência da influência de outliers; e) Problema de especificação; f) Problema de forma funcional. Para avaliar os efeitos específicos dos marcadores de plasticidade sináptica presentes nos modelos finais de regressão, foi realizada uma regressão linear simples entre as variáveis bioquímicas e os índices da VFC. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no pacote estatístico Stata 14.0 (Version 14; StataCorp LLC, Texas, USA).

Quadro 3 - Descrição dos testes estatísticos utilizados como pressupostos para atribuir confiabilidade ao modelo de regressão final.

Pressupostos	Teste Estatístico	Descrição
Heretocedasticidade	Breusch-Pagan Hetttest	Verifica a existência de subgrupos de dados que apresentam uma distribuição heterogenia que pode influenciar a predição do modelo de regressão.
Multicollinearidade	Fator de Inflação de Variância	Verifica se uma variável no modelo de regressão pode ser predita linearmente pelas outras variáveis incluídas no modelo, prejudicando sua precisão.
Normalidade da distribuição dos resíduos	Teste Shapiro-Wilk	Verifica se os resíduos apresentam distribuição normal, caso eles não apresentem esta distribuição modelo de predição não-lineares podem ser mais adequados.
Ausência da influência de <i>outliers</i>	Distância de Cook	Verifica a influência individual de cada caso no modelo de regressão para verificar se há a presença de algum <i>outlier</i> que esteja possuindo um viés na análise.
Problema de especificação	Teste de Link	Verifica a probabilidade de identificar corretamente a variável dependente baseando-se nas variáveis presentes no modelo de regressão final.
Problema de forma funcional	Teste de Forma Funcional Apropriada	Verifica se a todas as variáveis incluídas no modelo possuem efeito preditivo para a variável dependente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados da correlação de Pearson entre os índices da VFC e os biomarcadores de neuroplasticidade. Observamos que níveis mais altos de fosforilação do resíduo Ser845 da subunidade GluA1 (P-GluA1-Ser845) na AMI e no HIPa estão associados a valores mais baixos de Ln (SDNN) (AMI $r = -0,54$, $p = 0,02$ e HIPa $r = -0,57$, $p = 0,01$), Ln (rMSSD) (AMI $r = -0,40$, $p = 0,10$ e $r = -0,45$, $p = 0,06$) e Ln (HF) (AMI $r = -0,44$, $p = 0,07$ e HIPa $r = -0,45$, $p = 0,06$), sugerindo que os níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI e HIPa prejudicam os índices da VFC mediados pelo SNP. Nós observamos uma tendência estatística para a correlação de Pearson entre fosforilação do resíduo Ser831 da subunidade GluA1 (P-GluA1-Ser831) no HIPa e Ln (SDNN) ($r = 0,43$, $p = 0,07$), mas esta associação não foi encontrada na comparação com a AMI (valores de r entre 0,13 e 0,28, $p > 0,05$) ou com outros índices da VFC (valores de r entre 0,20 e 0,29, $p > 0,05$), indicando um possível erro tipo I (“falso positivo”).

Para avaliar se a associação observada entre os níveis de P-GluA1-Ser831 e P-GluA-Ser845 e os índices de HRV não resultaram de viés decorrente da variação no grau de atrofia devido à perda neuronal ou gliose das estruturas analisadas, avaliamos a correlação de Pearson entre os índices de VFC, tais como Ln (SDNN), Ln (rMSSD) e Ln (HF) e os níveis da subunidade GluA1 e GFAP nas mesmas amostras das estruturas avaliadas. Houve uma tendência estatística ($r = 0,41$, $p = 0,09$) para associação positiva entre os níveis de GFAP na AMI e o Ln (SDNN). Não foram observadas outras associações significativas ($p > 0,10$) entre os índices de VFC e os marcadores de plasticidade sináptica no HIPa e AMI dos pacientes. Os resultados sugerem que a VFC de repouso dos pacientes não foi significativamente associada às variações dos níveis de GFAP e de GluA1. Para fins de análise, os níveis de GFAP na AMI foram incluídos, juntamente com outras variáveis demográficas e clínicas, na análise por regressão linear múltipla realizada (ver adiante, item 3.2) para identificar os marcadores de neuroplasticidade independentemente associados ao índice Ln (HF). Para investigar as variáveis preditivas dos índices Ln (rMSSD) e Ln (SDNN) não foi incluído os níveis de GFAP nas estruturas por não se mostrarem associados à variável dependente de interesse com um nível de $p < 0,10$, conforme os critérios estatísticos para inclusão de variável no modelo de regressão final (ver adiante, item 3.3).

Tabela 1 - Marcadores bioquímicos de plasticidade sináptica (P-GluA1-Ser831, P-GluA1-Ser845, GluA1 e GFAP) na AMI, HIPa e NTM associados ao tônus cardíaco vagal mensurado por meio da VFC.

Variáveis	<i>Ln</i> (SDNN)		<i>Ln</i> (rMSSD)		<i>Ln</i> HF)	
	Coeficiente de		Coeficiente de		Coeficiente	
	Pearson	<i>p</i>	Pearson	<i>p</i>	de Pearson	<i>p</i>
AMI						
P-GluA1-Ser831	0,20	0,41	0,28	0,25	0,13	0,60
P-GluA1-Ser845	-0,54	0,02	-0,40	0,10	-0,44	0,07
Subunidade GluA1	0,01	0,97	0,01	0,99	0,12	0,63
GFAP	0,19	0,44	0,29	0,23	0,41	0,09
HIPa						
P-GluA1-Ser831	0,43	0,07	0,29	0,24	0,20	0,42
P-GluA1-Ser845	-0,57	0,01	-0,45	0,06	-0,45	0,06
Subunidade GluA1	0,18	0,47	0,26	0,30	0,35	0,16
GFAP	0,33	0,19	0,17	0,50	0,26	0,30
NTM						
P-GluA1-Ser831	0,38	0,11	0,32	0,18	0,17	0,48
P-GluA1-Ser845	-0,27	0,26	-0,24	0,33	-0,31	0,20
Subunidade GluA1	-0,11	0,64	0,15	0,53	0,24	0,32
GFAP	0,14	0,55	0,38	0,11	0,29	0,23

Legenda: GFAP, Proteína ácida fibrilar glial; AMI, Amígdala; HIPa, Hipocampo anterior; NTM, Neocórtex temporal médio; *Ln* (SDNN), Transformada logarítmica do desvio padrão dos intervalos R-R; Transformada logarítmica da raiz quadrada média das diferenças sucessivas; *Ln* (HF) Transformada logarítmica do índice de alta frequência (0,15Hz a 0,4Hz). As variáveis que apresentaram um valor de $p < 0,10$ estão destacadas em negrito.

3.1 OS ÍNDICES DA VFC ESTÃO ASSOCIADOS AOS NÍVEIS DOS BIOMARCADORES DE NEUROPLASTICIDADE NO HIPOCAMPO ANTERIOR E NA AMÍGDALA, MAS NÃO NO NEOCÓRTEX TEMPORAL MÉDIO

É amplamente aceito que os processos emocionais são mediados por estruturas do sistema límbico como a AMI e HIPa (CATANI; DELL'ACQUA; THIEBAUT DE SCHOTTEN, 2013; DAMASIO, 1998) e acredita-se que estas estruturas também estejam envolvidas nos circuitos de modulação autonômica do coração (BENARROCH, 1993; MUJICA-PARODI *et al.*, 2009; THAYER *et al.*, 2012). Para avaliar a especificidade da associação entre os níveis dos biomarcadores de neuroplasticidade na AMI e HIPa e os índices da VFC, avaliamos se os índices da VFC também estavam associados aos níveis de P-GluA1-Ser 831 e P-GluA1-Ser 845 das amostras de NTM. Não houve associação significativa entre variáveis neuroquímicas analisadas no NTM e os índices Ln (SDNN), Ln (rMSSD) ou Ln (HF) ($p > 0,10$). Os achados sugerem que a variação entre os níveis dos marcadores analisados e os índices de VFC dos pacientes é específica as regiões do HIPa e da AMI. (Tabela 1).

É importante destacar que vários estudos propõem uma divisão funcional entre o hipocampo ventral (HIPv) e dorsal (HIPd) de roedores (BANNERMAN *et al.*, 2014; FANSELOW; DONG, 2010) que no ser humano correspondem ao hipocampo anterior (HIPa) e posterior (HIPp), respectivamente (O'LEARY; CRYAN, 2014). Estudos comportamentais demonstraram que a lesão no HIPd de roedores dificulta a consolidação da memória espacial no labirinto aquático de Morris (MOSER *et al.*, 1995), enquanto a lesão anatômica no HIPv aumenta o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (KJELSTRUP *et al.*, 2002), para ambos os experimentos, a lesão na outra área do hipocampo (HIPv e HIPd, respectivamente) não afeta o desempenho comportamental, sugerindo que o HIPd está associado à memória e o HIPv às respostas emocionais. Corroborando as evidências comportamentais, Fanselow e Dong (2010) demonstraram que o HIPv e o HIPd apresentam diferentes padrões de expressão gênica que permitem uma capacidade funcional distinta. A similaridade da expressão gênica entre o HIPa, a AMI e o hipotálamo corroboram a ideia de que o HIPv esteja envolvido com a produção de respostas emocionais e de estresse.

A relação entre os achados no HIP de roedores e o hipocampo humano sugerem que o HIPa esteja mais relacionado às emoções,

enquanto o HIPp está associado à consolidação da memória (O'LEARY; CRYAN, 2014). Em conjunto com os relatos prévios de associação entre o HIPa e as respostas emocionais (FANSELOW; DONG, 2010; KJELSTRUP *et al.*, 2002; O'LEARY; CRYAN, 2014) a associação observada entre os níveis de P-GluA1-Ser 831 na AMI ou no HIPa e a VFC, podem indicar que os mecanismos de plasticidade sináptica que ocorrem nestas estruturas também estejam associadas ao controle autonômico relacionado à regulação emocional.

Conforme proposto por Thayer e Lane (2009), a AMI é inibida tonicamente pelo córtex pré-frontal (CPF). Uma falha neste processo de inibição promove a ativação do núcleo central da amígdala o qual inibe o núcleo do trato solitário, ativando os neurônios simpatoexcitatórios na medula ventrolateral rostral. Esse processo representa a evocação de uma resposta emocional para a mobilização e energia, refletindo uma redução no tônus cardíaco vagal. Embora o modelo de integração neurovisceral não inclua o HIP no circuito neuroanatômico responsáveis pela regulação cardíaca autonômica, ele participa do CAN (BENARROCH, 1993; SHOEMAKER *et al.*, 2015). Mais especificamente, o HIPa apresenta uma similaridade de expressão gênica com a AMI (FANSELOW; DONG, 2010) e ambos estão envolvidos (KJELSTRUP *et al.*, 2002) e influenciam as respostas emocionais (PHELPS, 2004), suportando sua participação na manutenção da VFC.

3.2 ASSOCIAÇÕES ENTRE OS ÍNDICES DA VFC E AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES

Algumas variáveis clínicas e demográficas se mostraram associadas aos índices de VFC (Tabela 2). O tempo de doença ($r = -0,512, p = 0,02$), os escores da escala HADS-D ($r = -0,537, p = 0,03$) e o nível sérico de fenobarbital ($r = -0,686, p = 0,003$) mostraram-se negativa e significativamente associado ao Ln (SDNN). A idade ($r = -0,512, p = 0,06$) e o tratamento com politerapia ($p = 0,07$) mostraram tendência de associação negativa ao Ln (SDNN). O nível sérico de fenobarbital mostrou-se negativa e significativamente ao Ln (rMSSD) ($r = -0,686, p = 0,003$) e ao Ln (HF) ($r = -0,715, p = 0,001$). Houve uma tendência para associação positiva entre o rMSSD e o sexo masculino ($p = 0,06$), lado esquerdo da esclerose do hipocampo ($p = 0,07$), tempo de doença ($r = -0,406, p = 0,09$), e negativa com uso de benzodiazepínicos

($p = 0,10$). A variação do Ln (HF) mostrou uma tendência de associação negativa com o tempo de doença ($r = - 0,444$, $p = 0,06$) e com o tratamento com benzodiazepínicos ($p = 0,06$)

Achados prévios sugerem que pacientes com epilepsia apresentam uma redução índices da VFC mediados pelo SNP durante o registro em repouso (LOTUFO *et al.*, 2012). Uma meta análise que contemplou 39 estudos sobre VFC e epilepsia (LOTUFO *et al.*, 2012) mostrou que pacientes com epilepsia refratária apresentam valores mais baixos de Ln (HF), Ln (SDNN) e Ln (rMSSD) quando comparados a controles saudáveis ou pacientes com epilepsia bem controlada, sugerindo que a redução do tônus cardíaco vagal está associado a frequência de crises epilépticas. Suorsa *et al.* (2011), em um estudo longitudinal, reportaram que prejuízo na manutenção dos índices vagais é progressivo de acordo com os anos da doença, já que os pacientes com epilepsia refratária tiveram uma redução progressiva nos índices da VFC durante os anos acompanhamento quando comparados a pacientes com crises epilépticas controladas. Estes resultados vão ao encontro da associação negativa entre a redução da VFC e o tempo de doença observada em nossa amostra de pacientes. Interessantemente, os índices de VFC em nossos pacientes não se mostraram significativamente associados à frequência mensal das crises epilépticas.

Outra variável clínica associada à diminuição da VFC na ELTM-EH é o lado da esclerose do hipocampo. Estudos anteriores relataram que pacientes com ELTM cujas crises epilépticas ocorrem do lado direito estariam mais relacionadas ao aumento do tônus simpático e aquelas do lado esquerdo aumentam o tônus parassimpático (MAYER *et al.*, 2004; PANCHANI *et al.*, 2011). É possível que a cronicidade de crises do lado direito (associado ao aumento da atividade simpática) pode estar relacionado ao comprometimento no processo de inibição parassimpática, já que a atividade simpática excessiva está relacionada a uma redução na VFC em pacientes com epilepsia (LOTUFO *et al.*, 2012; THAYER *et al.*, 2012; THAYER; YAMAMOTO; BROSSCHOT, 2010).

Como observado em nosso estudo, alguns pesquisadores mostraram que os benzodiazepínicos intravenosos prejudicam a regulação do tônus vagal autonômico cardíaco (diminuindo a VFC) de forma dose-dependente (ADINOFF *et al.*, 1992; AGELINK *et al.*, 2002). Corroborando nossos resultados, um estudo comparando pacientes com epilepsia que faziam monoterapia com diferentes AEDs mostrou que, quando comparados ao grupo controle, houve uma redução na VFC e esta diferença variava de acordo com fármaco utilizado, sendo

que o fenobarbital foi o que mostrou maior associação com a redução nos índices da VFC (HALLIOGLU *et al.*, 2008). Além do comprometimento na manutenção da VFC, alguns autores discutem a possibilidade de que AEDs poderiam contribuir para arritmias fatais em pacientes predispostos e que a politerapia poderia ser um fator de risco independente para a ocorrência de morte por razão inesperada em epilepsia (SUDEP do inglês, *Sudden Unexpected Death*) (NILSSON *et al.*, 1999; SURGES *et al.*, 2009a). Como a VFC pode ser um fator comum entre o risco de tratamento farmacológico na epilepsia e na SUDEP (BAYSAL-KIRAC *et al.*, 2017; DEVINSKY, 2004; GALLI; LOMBARDI, 2017; LOTUFO *et al.*, 2012; RYVLIN *et al.*, 2013; SURGES *et al.*, 2009b; TOMSON; NASHEF; RYVLIN, 2008) a avaliação rotineira da VFC pode ser um marcador importante na rotina clínica de pacientes com epilepsia. Contudo, a verificação e possível comprovação desta hipótese é dificultada pela incidência relativamente baixa de SUDEP com registro simultâneo do ECG e a necessidade de uma amostra grande de pacientes a serem seguidos prospectivamente.

A associação negativa entre escores de depressão e variabilidade da frequência cardíaca também é descrita em pacientes psiquiátricos (KEMP *et al.*, 2010), os resultados observados em nossa amostra sugerem que o prejuízo na regulação emocional relacionado à diminuição da VFC pode estar associada à maior prevalência de transtornos psiquiátricos na epilepsia (GAITATZIS; TRIMBLE; SANDER, 2004; GUARNIERI *et al.*, 2009). Portanto, a redução da VFC parece estar associada capacidade de regulação emocional de forma geral, uma vez que pode ser observada em vários distúrbios psiquiátricos e neurológicos (CHALMERS *et al.*, 2014; KEMP *et al.*, 2010; LOTUFO *et al.*, 2012; THAYER *et al.*, 2009, 2012; THAYER; LANE, 2000), tais como , ansiedade, depressão ou epilepsia que têm em comum o comprometimento da regulação emocional.

Contrário as nossas expectativas, a escala de sintomas para ansiedade HADS-A não apresentou associação aos índices de VFC, apenas a escala de sintomas para depressão HADS-D apresentou correlação significativa com Ln (SDNN). Embora muitos estudos tenham relatado que pacientes diagnosticados de acordo com os critérios de diagnóstico do eixo de ansiedade do DSM (Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) (por exemplo, transtornos de ansiedade generalizada ou fobia) apresentam uma redução nos escores da VFC, não encontramos essa relação em nossa amostra de pacientes com epilepsia (CHALMERS *et al.*, 2014; THAYER; LANE, 2000). Como

nenhum dos pacientes apresentou escore significativo para sintomas de ansiedade na HADS-A (escore < 9 pontos), é possível que a variação dos sintomas de ansiedade não patológicos pode não ter a mesma associação com a VFC dos estudos que comparam pacientes diagnosticados com ansiedade e controles hígidos (CHALMERS *et al.*, 2014). Vale ressaltar que as medidas de sintomas por meio de escalas psicométricas quantificam a magnitude de cada sensação associada ao quadro, sendo apenas uma das características necessárias para obter-se um diagnóstico via DSM, este é composto de uma avaliação de sintomas, mas também leva em consideração o impacto psicológico e social destas características. Assim, a utilização da VFC como biomarcador não invasivo de disfunção autonômica deve ser mais explorado na epilepsia para deixar claro o seu potencial para quantificar prejuízos no processo de regulação emocional em pacientes com ELTM-EH.

Tabela 2 - Resultados da análise univariada para avaliar a associação das variáveis clínicas, demográficas e dos parâmetros intraoperativos na manutenção do tônus autonômico cardíaco mensurado por meio da VFC.

Variáveis (n ou média ± DP)	Ln (SDNN)		Ln (rMSSD)		Ln (HF)	
	Média ± DP	<i>p</i>	Média ± DP	<i>p</i>	Média ± DP	<i>p</i>
Variáveis Clínicas						
Sexo						
Feminino (n = 11)	3,58 ± 0,38		2,68 ± 0,51		4,46 ± 1,14	
Masculino (n = 7)	3,70 ± 0,15	0,45	3,09 ± 0,21	0,06	5,00 ± 0,38	0,25
Lado da EH						
Direito (n = 7)	3,57 ± 0,47		2,60 ± 0,52		4,36 ± 1,22	
Esquerdo (n = 11)	3,66 ± 0,16	0,57	3,01 ± 0,36	0,07	4,86 ± 0,72	0,28
Tratamento de AEDs						
Monoterapia (n = 6)	3,81 ± 0,17		2,99 ± 0,21		4,91 ± 0,46	
Politerapia (n = 12)	3,54 ± 0,33	0,07	2,76 ± 0,54	0,33	4,55 ± 1,11	0,46
Uso de benzodiazepínicos						
Não (n = 7)	3,73 ± 0,26		3,05 ± 0,47		5,18 ± 0,68	
Sim (n = 11)	3,56 ± 0,33	0,27	2,71 ± 0,38	0,10	4,43 ± 0,97	0,06

Variáveis (n ou média ± DP)	Ln (SDNN)		Ln (rMSSD)		Ln (HF)	
	Coefficiente de Pearson	<i>P</i>	Coefficiente de Pearson	<i>P</i>	Coefficiente de Pearson	<i>P</i>
Idade, anos (37,73 ± 12,32)	- 0,440	0,06	- 0,347	0,15	- 0,337	0,17
Tempo de doença, anos (24,77 ± 12,14)	- 0,512	0,02	- 0,406	0,09	- 0,444	0,06
Frequência Mensal de Crises (12,96 ± 7,96)	0,068	0,78	0,104	0,68	0,136	0,58
Escore da HADS-A (8,53 ± 3,66)	0,196	0,48	0,310	0,26	0,332	0,22
Escore da HADS-D (7,20 ± 3,40)	- 0,537	0,03	- 0,383	0,15	- 0,337	0,21
Nível sérico de Fenobarbital (6,0 ± 3,46)	-0,686	0,003	-0,686	0,003	-0,715	0,001
Nível sérico de Carbamazepina (5,81 ± 11,13)	0,083	0,74	0,027	0,91	0,107	0,66

Variáveis (n ou média ± DP)	<i>Ln</i> (SDNN)		<i>Ln</i> (rMSSD)		<i>Ln</i> (HF)	
Parâmetros Intraoperatórios						
Pressão Arterial Média (67,17 ± 8,88)	0,32	0,20	0,03	0,90	0,10	0,69
Frequência Cardíaca Média (74,23 ± 13,39)	0,02	0,91	0,04	0,85	0,03	0,90
Parâmetros do Sangue						
pH (7,40 ± 0,03)	0,09	0,72	0,29	0,23	0,28	0,24
PCO ₂ (27,90 ± 5,34)	0,12	0,61	0,11	0,64	0,18	0,47
HCO ₃ (19,87 ± 1,94)	0,10	0,67	0,02	0,92	0,02	0,91
PO ₂ (227,49 ± 46,77)	0,05	0,83	0,01	0,98	0,01	0,97
Saturação de O ₂ (99,6 ± 0,24)	0,07	0,78	0,09	0,71	0,01	0,96
Hematócrito (35,12 ± 3,31)	0,07	0,77	0,13	0,60	0,18	0,46
Hemoglobina (11,57 ± 1,06)	0,01	0,95	0,15	0,52	0,19	0,44
Glicose (119,81 ± 28,66)	0,26	0,32	0,22	0,40	0,25	0,34
Sódio (138,27 ± 3,84)	0,07	0,75	0,05	0,83	0,01	0,97

Variáveis (n ou média ± DP)	<i>Ln</i> (SDNN)		<i>Ln</i> (rMSSD)		<i>Ln</i> (HF)	
Potássio (4,18 ± 0,37)	0,11	0,65	0,21	0,39	0,11	0,66
Cálcio iônico (4,22 ± 0,97)	0,01	0,96	0,07	0,77	0,04	0,87
Magnésio (0,47 ± 0,03)	0,35	0,17	0,10	0,70	0,01	0,98
Ácido Láctico (2,05 ± 1,16)	0,17	0,48	0,17	0,47	0,24	0,31
Parâmetros de tempo de coleta das amostras de tecido						
Tempo de armazenamento das amostras (meses) ^A (18,41 ± 5,52)	0,12	0,61	0,12	0,62	0,10	0,68
Tempo desde a última crise epiléptica (horas) ^B (157,35 ± 162,17)	0,01	0,96	0,07	0,77	0,01	0,97
Tempo de coleta do NTM (min.) ^C (11,0 ± 5,14)	0,26	0,28	0,32	0,18	0,21	0,39
Tempo de coleta da AMI e HIPa(min.) ^D (201,05 ± 36,12)	0,30	0,23	0,06	0,80	0,01	0,96
Tempo de manipulação do HIPa(min.) ^E (227,17 ± 55,96)	0,03	0,90	0,37	0,14	0,35	0,15

Legenda: AMI, Amígdala; GFAP, Proteína glial fibrilar; HIPa, Hipocampo anterior; NTM, Neocórtex temporal médio; Ln (SDNN), Transformada logarítmica do desvio padrão dos intervalos R-R; Transformada logarítmica da raiz quadrada média das diferenças sucessivas; Ln (HF) Transformada logarítmica do índice de alta frequência (0,15Hz a 0,4Hz); HADS-A, Escores de ansiedade da escala de ansiedade e depressão hospitalar; HADS-D, Escores de depressão da escala de ansiedade e depressão hospitalar; AEDs, drogas antiepilépticas; EH, Esclerose do hipocampo; ^A Intervalo de tempo entre a coleta do tecido cerebral durante a neurocirurgia de LTM e a homogeneização da amostra para análise de Western blot (de 8 a 39 meses); ^B Intervalo de tempo entre a última crise epiléptica e a coleta da amostra de tecido cerebral (de 12 a 590 horas); ^C Intervalo de tempo entre a indução de anestesia até a coleta do NTM (de 119 a 255 min.); ^D Intervalo de tempo entre a indução da anestesia e a coleta de amostra da AMI e HIPa (de 160 a 360min.); ^E Intervalo de tempo entre a termo coagulação dos vasos do HIP e a completa ressecção do HIPa (de 5 a 25 min.). As variáveis que apresentaram um valor de $p < 0,10$ estão destacadas em negrito.

3.3 OS NÍVEIS DE P-GLUA1-SER-845 NO HIPOCAMPO ANTERIOR E AMIGDALA SÃO MARCADORES INDEPENDENTES DA VARIAÇÃO DO TÔNUS AUTONÔMICO CARDÁCO

Para investigar se as associações observadas entre os índices da VFC as variáveis bioquímicas poderiam ser decorrentes de viés de confusão relacionado à distribuição de variáveis clínicas e demográficas dos pacientes foram realizadas regressões lineares múltiplas. No método de regressão utilizado (*stepwise backward*), apenas as variáveis com a maior associação são mantidas no modelo. Embora a análise univariada inicial tenha mostrado um maior número de variáveis individualmente associadas aos índices da VFC, as que permanecem no modelo final apresentam maior poder preditivo.

Nestas análises os índices de VFC foram consideradas as variáveis dependentes e foram incluídas, além das variáveis de neuroquímica de interesse, as variáveis clínicas e demográficas que individualmente se mostraram associadas aos índices de VFC com nível de significância de $p < 0,10$ na análise univariada preliminar (Tabela 2). As análises multivariadas foram feitas separadamente para cada um dos índices da VFC (Tabela 3).

O modelo final de regressão múltipla para predição do Ln (SDNN) incluiu o tempo de doença e níveis de P-GluA1-Ser845 no HIPa ($r^2 = 0,61$, $p = 0,005$). Observou-se uma colinearidade entre os níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI e HIPa ($r^2 = 0,63$, $p = 0,008$) e os níveis deste biomarcador na AMI e HIP separadamente explicaram respectivamente 25% ($r^2 = 0,25$) e 34% ($r^2 = 0,34$) da variabilidade do índice Ln (SDNN). O modelo final de regressão múltipla para predição do Ln (rMSSD) incluiu o tempo de doença e os níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI ($r^2 = 0,52$, $p = 0,01$). Os níveis deste biomarcador na AMI e HIPa separadamente explicaram respectivamente 44% ($r^2 = 0,44$) e 24% ($r^2 = 0,24$) da variação do Ln (rMSSD). Por fim, o tempo de doença e os níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI se mostraram independentemente associados à variação do Ln (HF) ($r^2 = 0,59$, $p = 0,04$). Os níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI e no HIPa separadamente explicaram 28% ($r^2 = 0,28$) e 17% ($r^2 = 0,17$) da variação do Ln (HF). Portanto, os resultados mostram que o tempo de doença combinado aos níveis de P-GluA1-Ser845 (na AMI ou HIPa) podem prever 61%, 52% e 59% das variações Ln (SDNN), Ln (rMSSD) e Ln (HF), respectivamente.

Tabela 3 - Modelos finais de regressão múltipla para o Ln (SDNN), Ln (rMSSD) e Ln (HF) as variáveis clínicas e marcadores de neuroplasticidade independentemente associados ao tônus cardíaco vagal avaliado através dos índices da VFC.

Variáveis	Coefficiente r^2	r^2 Ajustado	Coefficiente B (IC 95%)	p
<i>Ln</i> (SDNN)				
Modelo Final	0,61	0,54		0,005
Constante			6,54 (4,79 a 8,29)	0,0001
Tempo de doença (anos)			-0,01 (-0,02 a -0,001)	0,02
Níveis de P-GluA1-Ser845 no HIPa			-0,02 (-0,03 a -0,008)	0,006
Modelo com HIPa	0,38	0,34		0,009
Constante			6,05 (4,29 a 7,81)	0,0001
Níveis de P-GluA1-Ser845			-0,02 (-0,03 a -0,006)	0,01
Modelo com AMI	0,29	0,25		0,02
Constante			4,65 (3,76 a 5,54)	0,0001
Níveis de P-GluA1-Ser845			-0,009 (-0,17 a -0,001)	0,02
<i>Ln</i> (rMSSD)				
Modelo Final	0,52	0,44		0,01
Constante			4,89 (3,57 a 6,22)	0,0001

Tempo de doença (anos)			-0,015 (-0,03 a 0,001)	0,07
Níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI			-0,016 (-0,027 a -0,004)	0,01
Modelo com HIPa	0,29	0,24		0,03
Constante			-0,02 (-0,05 a -0,002)	0,001
Níveis de P-GluA1-Ser845			5,89 (3,02 a 8,75)	0,03
Modelo com AMI	0,31	0,26		0,02
Constante			4,48 (2,97 a 5,99)	0,0001
Níveis de P-GluA1-Ser845			-0,01 (-0,02 a -0,001)	0,02
<hr/>				
<i>Ln (HF)</i>				
<hr/>				
Modelo Final	0,59	0,52		0,004
Constante			8,96 (6,42 a 11,50)	0,0001
Tempo de doença (anos)			-0,42 (-0,76 a -0,008)	0,018
Níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI			-0,03 (-0,05 a 0,008)	0,01
Modelo com HIPa	0,23	0,17		0,05
Constante			10,38 (4,31 a 16,45)	0,003
Níveis de P-GluA1-Ser845			-0,05 (-0,10 a 0,002)	0,06
Modelo com AMI	0,33	0,28		0,02
Constante			8,02 (5,07 a 10,97)	0,0001
Níveis de P-GluA1-Ser845			-0,03 (-0,06 a -0,005)	0,02

Legenda: AMI, Amígdala; HIPa, Hipocampo anterior; *Ln* (SDNN), Transformada logarítmica do desvio padrão dos intervalos R-R; Transformada logarítmica da raiz quadrada média das diferenças sucessivas; *Ln* (HF) Transformada logarítmica do índice de alta frequência (0,15Hz a 0,4Hz). Os modelos de regressão que apresentaram um valor de $p < 0,05$ estão destacadas em negrito.

Como descrito por Lotufo *et al.* (2012), pacientes com epilepsia apresentam uma disfunção autonômica que reflete um comprometimento do tônus vagal cardíaco, por exemplo, *Ln* (rMSSD) ou *Ln* (HF). Entre todas as variáveis clínicas apenas o tempo de doença permaneceu independentemente associada ao modelo final, sugerindo duas possibilidades. Primeira, uma vez que todos os pacientes são resistentes ao tratamento farmacológico, o tempo da doença pode refletir a gravidade da doença em geral, já que os pacientes não tiveram controle das crises ao longo dos anos, a frequência total de crises cumulativa aumenta ao longo dos anos. Segundo, por ser uma medida escalar e apresentar maior variância do que as medidas clínicas categóricas (perguntas sim ou não), o tempo de doença pode se adequar melhor ao modelo final de regressão devido seu axioma de medida.

Nossos resultados mostram que para todos os índices de VFC analisados os níveis de P-GluA1-Ser845 (na AMI ou no HIPa) se mostraram negativamente associados ao o tônus vagal cardíaco em repouso. Conforme mencionado anteriormente, o modelo de integração neurovisceral (THAYER; LANE, 2000, 2009; THAYER *et al.*, 2012) propõe que durante uma condição de repouso em um lugar seguro a AMI está sob inibição tônica por sinapses GABAérgicos do CPF e que o funcionamento adequado desta relação pode ser um indicador de que o indivíduo o reconheceu os de sinais de segurança do ambiente e inibiu respostas emocionais de mobilização de energia. Segundo o modelo, a inibição adequada da AMI está relacionada a uma alta atividade do tônus cardíaco vagal (índices da VFC elevados) e este padrão de funcionamento seria um indicativo de uma regulação emocional adequada do ponto de vista de homeostase para o contexto de ausência de estímulos aversivos.

Considerando os achados prévios da literatura na área de VFC e sua relação com a AMI e HIPa, existe plausibilidade biológica para os resultados observados. Neste contexto, nossos resultados indicariam a ocorrência de mudanças na plasticidade sináptica na AMI e no HIPa, mais especificamente, uma diminuição dos níveis de P-GluA-Ser845 estão associadas a redução do tônus cardíaco vagal de repouso. Tais modificações poderiam ser causa ou consequência de uma anormalidade na inibição da AMI pelo CPF e, conseqüentemente na regulação emocional e nos índices de VFC. Como a AMI é densamente conectada com o HIPa, especulamos que a sobreposição de associação entre os achados bioquímicos destas estruturas e os índices de VFC se devam ao envolvimento concomitante de ambas na CAN. O desenho experimental deste estudo (estudo de associação) não permite

estabelecer uma relação de causa e efeito entre as variáveis preditivas e o tônus cardíaco vagal avaliado pela VFC e a possibilidade de associação espúria não pode ser excluída por completo.

A fosforilação de GluA-Ser845 está relacionada com a manutenção (sinapses “*naive*”) ou a LTD (LEE *et al.*, 2000). Portanto, nossos resultados sugerem que, nas amostras coletadas da AMI e HIPa como um todo (homogeneizadas), a potenciação sináptica que se acompanha de um o aumento de GluA1 acoplados a membrana celular está associada redução tônus cardíaco vagal de repouso (menores índices de VFC). De acordo com o modelo de integração neurovisceral (THAYER; LANE, 2000, 2009), uma inibição adequada da AMI por sinapses GABAérgicas de terminais sinápticos oriundos do CPF resulta no aumento dos índices da VFC. Nossa hipótese é que um fenômeno do tipo LTP na AMI (e HIPa) seja um indicativo de um prejuízo no processo de inibição da AMI pelo CPF. Embora não seja possível concluir se os achados bioquímicos são a causa ou um fenômeno compensatório (consequência) das modificações do tônus cardíaco vagal determinado pela VFC, esta é a primeira evidência científica do envolvimento de mecanismos de plasticidade sináptica em estruturas do sistema límbico humano que compõe o CAN. Esses resultados vão ao encontro aos relatos de neuroimagem funcional (MUJICA-PARODI *et al.*, 2009; THAYER *et al.*, 2012; SAKAKI *et al.*, 2016) mostrando que o aumento da atividade de AMI ou HIPa estão associados a menores índices de VFC.

3.4 OS NÍVEIS DE P-GLUA-SER845 TANTO NA AMI COMO NO HIPa SÃO PREDITORES DA VFC

Para determinar o valor individual dos biomarcadores de neuroplasticidade na predição da VFC, foram feitas regressões lineares simples entre os níveis de P-GluA1-Ser845 (na AMI e no HIPa) e os índices de VFC (*Ln* SDNN, *Ln* rMSSD e *Ln* HF) (Tabela 3). Os níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI e no HIPa estiveram negativamente associados a todos os índices de VFC. Na AMI e no HIPa estes marcadores explicaram respectivamente 29% e 38% da variação do SDNN ($r^2 = 0,31$, $p = 0,02$ para AMI e $r^2 = 0,29$, $p = 0,03$ para HIPa). Já no caso do rMSSD, 31% e 29% de sua variação foram explicados pelos níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI e no HIPa respectivamente ($r^2 = 0,31$, $p = 0,02$ para AMY e $r^2 = 0,29$, $p = 0,03$ para HIPa). Por fim, a 33% e 23% variação do *Ln* (HF) pode ser explicada apenas pelos níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI e no HIPa ($r^2 = 0,33$, $p = 0,02$ para AMI e

$r^2 = 0,23$, $p = 0,05$ para HIPa, respectivamente). Esta concomitância (colinearidade) e semelhança (associação negativa) da associação entre os níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI e no HIPa com todos os índices de VFC sugere que em ambas as estruturas este biomarcador seja uma medida preditiva dos índices de VFC. Apesar de serem estruturas diferentes, com funcionalidades distintas, observamos valores semelhantes de r^2 para a regressão linear utilizando as variáveis bioquímicas na AMI (valores de r^2 entre 0,29 e 0,33) e no HIPa (valores de r^2 entre 0,23 e 0,38), indicando que ambas as estruturas estão associadas à manutenção do tônus vagal. Conforme descrito em tópicos anteriores, embora apenas AMI seja descrita no modelo neurovisceral (THAYER; LANE, 2000, 2009) o HIPa também participa da CAN (BENARROCH, 1993; SHOEMAKER *et al.*, 2015), está relacionado fortemente envolvido na modulação de respostas emocionais (FANSELOW; DONG, 2010; KJELSTRUP *et al.*, 2002; O'LEARY; CRYAN, 2014) além de possuir um substrato genético semelhante à AMI e ao hipotálamo (FANSELOW; DONG, 2010). Embora a relação de causa e efeito não seja possível de ser estabelecida no presente estudo de associação, nós especulamos que o HIPa, através de modificações na plasticidade sináptica semelhantes às observadas na AMI, também participe da modulação da manutenção do tônus cardíaco vagal.

3.5A RELAÇÃO ENTRE A NEUROPLASTICIDADE NO SISTEMA LÍMBICO E TÔNUS AUTONÔMICO CARDÍACO NA ADAPTAÇÃO À EVENTOS ESTRESSORES

A exposição aguda a eventos estressores é responsável por gerar respostas endócrinas que tem potencial para melhorar a eficiência sináptica em estruturas do sistema límbico para tornar a adaptação do organismo mais eficiente a curto prazo (WHITEHEAD *et al.*, 2013). Estudos em roedores demonstraram que a indução de estresse agudo aumenta os níveis de glutamato no meio extracelular da AMI, sugerindo que a maior disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica pode facilitar a responsabilidade do sistema límbico para gerar respostas emocionais (REZNIKOV *et al.*, 2007). Mais especificadamente, eventos estressores a curto prazo estão associados ao aumento de P-GluA-Ser845 na AMI e no HIPv e a redução de P-GluA-Ser831 no CPF e no HIPd (CAUDAL *et al.*, 2010). Conforme reportado em outros trabalhos, o HIPv está mais relacionado aos processos emocionais, enquanto o

HIPd é associado a produção de memórias espaciais (FANSELOW; DONG, 2010; KJELSTRUP *et al.*, 2002). Sendo assim, o processo de aumento na eficiência sináptica a curto prazo em decorrência de eventos estressores, otimiza estruturas relacionadas com a produção de respostas emocionais (AMI e HIPv), enquanto prejudica a eficiência de estruturas voltadas ao controle cognitivo (CPF e HIPd), indicando que o organismo se adapta para produzir respostas emocionais com maior frequência.

Fazendo a translação dos resultados observados em roedores, nosso grupo reportou que uma dose de dexametasona, glicocorticoide liberado durante respostas a estímulos estressores (RODRIGUES; LEDOUX; SAPOLSKY, 2009), reduz P-GluA1-Ser831 na AMI (LOPES *et al.*, 2016). Interessantemente, o grupo do Prof. Dr. Roger Walz demonstrou que em pacientes com ELTM-EH que apresentam a manifestação inicial da crise epiléptica como sendo do tipo “medo ictal”, mas não outros tipos de manifestações sensoriais ou emocionais, apresentam um aumento nos níveis P-GluA1-Ser845 no HIPa (LEAL *et al.*, 2018). Infelizmente, o tamanho da amostra do presente estudo não permitiu analisar a eventual associação entre a ocorrência de aura de medo ($n = 2$) e os índices de VFC.

Portanto, conforme demonstrado neste trabalho o estado de fosforilação dos AMPARs no sistema límbico está associado com adaptações na VFC, e poderia indicar que mecanismos de plasticidade sináptica no sistema límbico humano (AMI e HIPa) estejam envolvidos na modulação da resposta autonômica cardíaca. A exposição a ameaças reais ou imaginárias estão intimamente ligadas à resposta autonômica e também com distúrbios psiquiátricos as quais também se associam a modificações na VFC. É possível que as associações observadas entre a VFC e a neuroplasticidade na AMI e HIPa dos nossos pacientes estejam, de alguma forma, ligadas a ocorrência de transtornos psiquiátricos como ansiedade, depressão e estresse pós-traumático. Neste estudo os modelos finais de regressão linear não evidenciaram associação entre os sintomas de ansiedade e depressão e os níveis de marcadores bioquímicos. Entretanto é importante considerar as limitações do tamanho da amostra estudada, e a possibilidade de resultados falso negativos de associação entre os marcadores analisados e as escalas de sintomas psiquiátricos.

A aplicação da VFC como forma não-invasiva para estimar a eficiência sináptica do sistema límbico pode ser importante para compreender como a produção de comportamentos adaptativos ao estresse a curto prazo podem se tornar comportamentos mal adaptativos que resultam no desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos. Assim, o

desenvolvimento de métodos matemáticos e de análise não lineares da VFC pode melhorar a acurácia do uso da VFC como biomarcador de regulação emocional e que seu acompanhamento a longo prazo pode colaborar no desenvolvimento de métodos inovadores para diagnóstico e prognóstico de transtornos psiquiátricos associados à modificações no tônus autonômico cardíaco (ETKIN; BÜCHEL; GROSS, 2015; GROSS, 1998, 2015; THAYER *et al.*, 2012; THAYER; LANE, 2000, 2009).

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, este trabalho demonstrou que os níveis de marcadores bioquímicos de plasticidade sináptica na AMI e no HIPa estão associados ao tônus cardíaco vagal em repouso, avaliado através da VFC. Os resultados mostram que os níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI ou HIPa em combinação com o tempo de epilepsia pode explicar 52% a 61% da variação dos índices de VFC analisados (Ln SDNN, Ln rMSSD e Ln HF). Para todos os índices de VFC, os níveis de P-GluA1-Ser845 tanto na AMI como HIPa se mostraram negativamente associados à manutenção do tônus cardíaco vagal. Os níveis de P-GluA1-Ser845 na AMI e no HIPa podem explicar, individualmente de 23% a 38% da variação interindividual dos índices de VFC respectivamente.

Para o modelo neurovisceral integrativo (THAYER; LANE, 2000, 2009), nossos resultados fornecem as primeiras evidências bioquímicas de que a regulação de AMPARs por P-GluA1-Ser-845 não apenas na AMI mas também no HIPa está relacionada ao comprometimento do tônus cardíaco vagal em repouso. Os resultados corroboram as evidências de neuroimagem funcional que sugerem que a maior atividade do AMI e do HIPa estão associadas a menores índices de VFC mediados pelo nervo vagal. (MUJICA-PARODI *et al.*, 2009; SAKAKI *et al.*, 2016; THAYER *et al.*, 2012). A redução nos valores de P-GluA1-Ser845 sugere um deslocamento do equilíbrio da eficiência sináptica indicando um perfil semelhante ao produzido durante a LTD. Nós especulamos que esta redução na eficiência sináptica na AMI e HIPa, de alguma forma possa causar ou ser decorrente da facilitação dos processos de inibição tônica por sinapses GABAérgicas do CPF sobre a AMI que consequentemente aumenta a VFC. O papel do HIPa nestes mecanismos descritos é desconhecido, mas considerando a densidade das conexões anatômicas entre a AMI e o HIPa, e o envolvimento de ambas as estruturas na modulação de processos emocionais é possível

que de alguma forma o HIPa contribua e integre, juntamente com a AMI o CPF.

Portanto, os índices de VFC são indicadores da regulação autonômica relacionada a estados emocionais e nossos resultados indicam estes índices também possam refletir mecanismos de plasticidade sináptica em estruturas límbicas envolvidas com as respostas emocionais central (THAYER; LANE, 2000, 2009). Sabemos que as respostas do estresse endócrino modulam a plasticidade sináptica no sistema límbico (LOPES *et al.*, 2016; WHITEHEAD *et al.*, 2013). A influência dessas alterações sobre AMY e HIPa no processo de regulação emocional pode auxiliar na compreensão do desenvolvimento de sintomas psiquiátricos após exposição prolongada ao estresse, uma vez que o comprometimento da regulação emocional está associado ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (ETKIN; BÜCHEL; GROSS, 2015; GROSS, 1998, 2015; THAYER *et al.*, 2012; THAYER; LANE, 2000, 2009). Portanto, nossos dados suportam que a VFC é um biomarcador não invasivo de regulação emocional, representando um elo comum entre o sistema nervoso central e autônomo (THAYER; LANE, 2000, 2009).

Conforme reportado por Lotufo *et al.* (2012), pacientes com MTLE-HS apresentam uma disfunção autonômica que reflete um comprometimento do tônus cardíaco vagal, ou seja, *Ln rMSSD* ou *Ln HF*. A menor VFC de repouso observada em pacientes com epilepsia é prejudicada de acordo com a gravidade da doença, pois provavelmente está relacionada à ocorrência de convulsões. A deterioração progressiva do tônus cardíaco vagal torna a VFC uma importante ferramenta no seguimento clínico de pacientes com epilepsia (RAUSCHER *et al.*, 2011; SUORSA *et al.*, 2011). Além de estar relacionada à gravidade dos sintomas gerais da epilepsia, a relação entre a função cardíaca e a SUDEP (BAYSAL-KIRAC *et al.*, 2017; FIALHO *et al.*, 2017, 2018; GALLI; LOMBARDI, 2017; LOTUFO *et al.*, 2012; RAUSCHER *et al.*, 2011) fazem do monitoramento da VFC uma alternativa para o desenvolvimento de métodos para a prevenção da SUDEP, que causa aproximadamente 17% das mortes em pacientes com epilepsia (SCORZA *et al.*, 2009; TOMSON *et al.*, 2005). A maior prevalência de diagnóstico psiquiátrico em pacientes com epilepsia (GAITATZIS; TRIMBLE; SANDER, 2004; GUARNIERI *et al.*, 2009) torna a avaliação da VFC um método possível para fornecer *insights* sobre a desregulação emocional de morbidades psiquiátricas de pacientes com epilepsia (BEAUCHAINE; THAYER, 2015; CHALMERS *et al.*, 2014; KEMP *et al.*, 2010). Em geral, os dados de longo prazo da VFC de

pacientes com epilepsia auxiliam no entendimento da tendência da gravidade da doença e contribuem para o cuidado de pacientes com epilepsia (BAYSAL-KIRAC *et al.*, 2017; GALLI; LOMBARDI, 2017; KEMP; KOENIG; THAYER, 2017), conforme observado no desenvolvimento de métodos para predição da ocorrência de crises epilépticas por meio da VFC (PAVEI *et al.*, 2017).

Este estudo tem algumas limitações a serem consideradas. Primeiro, o tecido cerebral usado é de pacientes com ELTM-EH, e os achados podem não serem completamente aplicáveis a indivíduos com outras formas de epilepsias, outros tipos de patologias neuropsiquiátricas ou mesmo pessoas híidas. Assim, modificações estruturais e funcionais relacionadas à epilepsia (por exemplo, gliose e perda neuronal) podem influenciar as variáveis neuroquímicas. Embora essa limitação deva ser considerada, a cirurgia da epilepsia de lobo temporal é a única oportunidade para se estudar de forma confiável o estado de fosforilação de proteínas em estruturas do sistema límbico humano, tornando este resultado um ponto de partida para investigar biomarcadores neuroquímicos de manutenção autonômica em modelos experimentais. Entretanto, como os roedores apresentam uma redução no tônus vagal, os achados nestes animais apresentam limitações do ponto de vista translacional para os seres humanos. O tamanho reduzido da amostra de pacientes é um ponto a ser considerado, uma vez que o reduzido poder do estudo pode levar à resultados falsos positivos e conseqüentemente a não detecção de associações que na realidade existem. Por outro lado, considerando-se os cuidados utilizados na coleta do material biológico, e os controles na distribuição de variáveis causadoras de potenciais vícios de confusão aumentando a confiabilidade dos resultados e sugerindo que as associações observadas sejam realmente significativas.

Nossos resultados são um ponto de partida para o uso da VFC investigação e diagnóstico psiquiátrico em pacientes com epilepsia (KEMP; KOENIG; THAYER, 2017; LABORDE; MOSLEY; THAYER, 2017; THAYER; YAMAMOTO; BROSSCHOT, 2010). Estudos recentes sugerem que registros ultra curtos da VFC (<1 min) podem fornecer índices mediados vagamente confiáveis (por exemplo, rMSSD) (MELO *et al.*, 2018; MUNOZ *et al.*, 2015; NUSSINOVITCH *et al.*, 2011), tornando a VFC um método rápido, não invasivo e de baixo custo que pode fornecer informações importantes sobre as características comportamentais e emocionais do paciente. Estudos futuros podem usar a abordagem experimental pré-clínica para investigar a relação de causa e efeito entre o estado de fosforilação de

subunidades específicas dos receptores AMPA na AMI e HIPa e as mudanças na VFC em repouso e durante testes comportamentais envolvendo tarefas aversivas medo e respostas de comportamentais de ansiedade em roedores e explorar o papel da VFC como biomarcador de regulação emocional.

4 CONCLUSÃO

O estado de fosforilação dos AMPARs na amígdala e no hipocampo anterior está associado ao tônus cardíaco vagal em repouso. Especificamente, os níveis de P-GluA1-Ser-845 na AMI e no HIPa estão inversamente relacionados aos índices autonômicos vagais avaliados por meio da VFC (Ln SDNN, Ln rMSSD e Ln HF), sugerindo que o aumento da eficiência sináptica na AMI e HIPa está associado à índices da VFC inferiores. Além dos biomarcadores de plasticidade sináptica, o tempo de doença epiléptica também contribui para o comprometimento do tônus autonômico cardíaco vagal. Esses resultados suportam o modelo integrativo neurovisceral sendo o primeiro estudo demonstrando a associação entre marcadores envolvidos com mecanismos de plasticidade sináptica no sistema límbico humano e a manutenção do tônus cardíaco vagal. Os achados contribuem para um melhor entendimento sobre o papel da plasticidade sináptica em estruturas do CAN do sistema nervoso central e a variabilidade da frequência cardíaca.

REFERÊNCIAS

- ABAD, C. *et al.* Heart rate variability in elite sprinters: effects of gender and body position. **Clinical Physiology and Functional Imaging**, v. 37, n. 4, p. 442–447, jul. 2017.
- ADINOFF, B. *et al.* Vagal tone decreases following intravenous diazepam. **Psychiatry Research**, v. 41, n. 2, p. 89–97, 1992.
- AGELINK, M. W. *et al.* Short-term effects of intravenous benzodiazepines on autonomic neurocardiac regulation in humans: A comparison between midazolam, diazepam, and lorazepam. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 5, p. 997–1006, 2002.
- ARAÚJO, D. *et al.* Volumetric evidence of bilateral damage in unilateral mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 8, 2006.
- AZEVEDO, F. A. C. *et al.* Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 513, n. 5, p. 532–541, 2009.
- BANNERMAN, D. M. *et al.* Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 181–192, 1 mar. 2014.
- BARBAS, H. *et al.* Serial pathways from primate prefrontal cortex to automatic areas may influence emotional expression. **BMC neuroscience**, v. 4, p. 1–12, 2003.
- BAYSAL-KIRAC, L. *et al.* Analysis of heart rate variability and risk factors for SUDEP in patients with drug-resistant epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 71, p. 60–64, 2017.
- BEAR, M. F. A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13453–13459, 1996.
- BEAUCHAINE, T. P.; THAYER, J. F. Heart rate variability as a transdiagnostic biomarker of psychopathology. **International Journal of Psychophysiology**, v. 98, n. 2, p. 338–350, nov. 2015.
- BENARROCH, E. E. The Central Autonomic Network: Functional Organization, Dysfunction, and Perspective. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 68, n. 10, p. 988–1001, out. 1993.
- BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 1993.
- BROWN, H. F.; DIFRANCESCO, D.; NOBLE, S. J. How does adrenaline accelerate the heart? **Nature**, v. 280, n. 5719, p. 235–236, 19 jul. 1979.
- CANNON, W. The James-Lange-theory of emotions: A critical

examination and an alternative theory. **The American Journal of Psychology**, v. 39, n. 1/4, p. 106–124, 1927.

CATANI, M.; DELL'ACQUA, F.; THIEBAUT DE SCHOTTEN, M. A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 8, p. 1724–1737, set. 2013.

CAUDAL, D. *et al.* Acute stress induces contrasting changes in AMPA receptor subunit phosphorylation within the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.

CHALMERS, J. A. *et al.* Anxiety Disorders are Associated with Reduced Heart Rate Variability: A Meta-Analysis. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, n. July, p. 1–11, 11 jul. 2014.

CHATER, T. E.; GODA, Y. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, n. 11, 1-14.

CHESS, G. F.; TAM, R. M.; CALARESU, F. R. Influence of cardiac neural inputs on rhythmic variations of heart period in the cat. **The American journal of physiology**, v. 228, n. 3, p. 775–80, 1975.

CULL-CANDY, S.; BRICKLEY, S.; FARRANT, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, p. 327-335, 2001.

DALGLEISH, T. The Emotional Brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. July, p. 252–256, 2004a.

DALGLEISH, T. The emotional brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 583, 1 jul. 2004b.

DAMASIO, A. R. Emotion in the perspective of an integrated nervous system. **Brain Research Reviews**, v. 26, n. 2–3, p. 83–86, maio 1998.

DARWIN, C. **Expression of the Emotions in Man and Animals**. 1. ed. Chicago: Chicago Univ. Press, 1872.

DE LEMOS ZINGANO, B. *et al.* Validation of diagnostic tests for depressive disorder in drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 50, 2015.

DEVINSKY, O. Effects of Seizures on Autonomic and Cardiovascular Function. **Epilepsy Currents**, v. 4, n. 2, p. 43–46, 2004.

DHEIN, S.; VAN KOPPEN, C. J.; BRODDE, O.-E. Muscarinic receptors in the Mammalian Heart. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 3, p. 161–182, set. 2001.

DIFRANCESCO, D. *et al.* Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. **J. Physiol.**, v. 1, n. 377, p. 61–88, maio 1986.

DIFRANCESCO, D.; TROMBA, C. Muscarinic control of the

- hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes. **The Journal of Physiology**, v. 1, n. 405, p. 493–510, 1988a.
- DIFRANCESCO, D.; TROMBA, C. Inhibition of the hyperpolarization-activated current (if) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes. **The Journal of Physiology**, v. 405, n. 1, p. 477–491, 1988b.
- ECKER, P. M. *et al.* Effect of targeted deletions of β 1 - and β 2 - adrenergic-receptor subtypes on heart rate variability. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 1, p. H192–H199, jan. 2006.
- EKMAN, P. *et al.* Emotion and autonomic nervous system activity. **Journal of personality and social psychology**, v. 62, n. 6, p. 972–988, 1992.
- EKMAN, P. Facial expressions of emotion: an old controversy and new findings. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 335, n. 1273, p. 63–9, 29 jan. 1992.
- EKMAN, P.; LEVENSON, R. W.; FRIESEN, WALLACE V. **Autonomic nervous system activity distinguishes among emotions**, 1983.
- ESCO, M. R.; FLATT, A. A. Ultra-short-term heart rate variability indexes at rest and post-exercise in athletes: Evaluating the agreement with accepted recommendations. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 13, n. 3, p. 535–541, 2014.
- ETKIN, A.; BÜCHEL, C.; GROSS, J. J. The neural bases of emotion regulation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 693–700, 1 nov. 2015.
- FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010.
- FIALHO, G. L. *et al.* Maximal/exhaustive treadmill test features in patients with temporal lobe epilepsy: Search for sudden unexpected death biomarkers. **Epilepsy Research**, v. 133, n. February, p. 83–88, 2017.
- FIALHO, G. L. *et al.* Echocardiographic risk markers of sudden death in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 140, p. 192–197, fev. 2018.
- FIEST, K. M.; SAJOBI, T. T.; WIEBE, S. Epilepsy surgery and meaningful improvements in quality of life: Results from a randomized controlled trial. **Epilepsia**, v. 55, n. 6, p. 886–892, jun. 2014.
- FLATT, A. A.; ESCO, M. R. Validity of the ithlete™ Smart Phone Application for Determining Ultra-Short-Term Heart Rate Variability. **J. Hum. Kinet.**, v. 39, n. 1, p. 85–92, 2013.

- FRIEDMAN, B. H.; THAYER, J. F. Autonomic Balance Revisited: Panic Anxiety and Heart Rate Variability. v. 44, n. 1, p. 133–151, 1998.
- FRIJDA, N. H. The Laws of Emotion. **American Psychologist**, v. 43, n. 5, p. 349–358, 1988.
- GAITATZIS, A.; TRIMBLE, M. R.; SANDER, J. W. The psychiatric comorbidity of epilepsy. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 110, n. 4, p. 207–220, 2004.
- GALLI, A.; LOMBARDI, F. Heart rate variability regression and risk of sudden unexpected death in epilepsy. **Medical Hypotheses**, v. 99, p. 49–52, fev. 2017.
- GREGER, I. H.; WATSON, J. F.; CULL-CANDY, S. G. Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Theirs Auxiliary Proteins. **Neuron Review**, v. 94, n. 4 713-730, 2017.
- GRIZZLE, W. E.; BELL, W. C.; SEXTON, K. C. Issues in collecting, processing and storing human tissues and associated information to support biomedical research. **Cancer biomarkers: section A of Disease markers**, v. 9, n. 1–6, p. 531–49, out. 2010.
- GROSS, J. J. The Emerging Field of Emotion Regulation: An Integrative Review. **Review of General Psychology**, v. 2, n. 3, p. 271–299, 1998.
- GROSS, J. J. Emotion Regulation: Current Status and Future Prospects. **Psychological Inquiry**, v. 26, n. 1, p. 1–26, 2 jan. 2015.
- GUARNIERI, R. *et al.* Do psychiatric comorbidities predict postoperative seizure outcome in temporal lobe epilepsy surgery? **Epilepsy & Behavior**, v. 14, n. 3, p. 529–534, mar. 2009.
- HAASE, V. G.; LACERDA, S. S. Neuroplasticidade, variação interindividual e recuperação funcional em neuropsicologia. **Temas em Psicologia da SBP**, v. 12, n. 1, p. 28–42, 2004.
- HALLIOGLU, O. *et al.* Effects of antiepileptic drug therapy on heart rate variability in children with epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 79, n. 1, p. 49–54, mar. 2008.
- HANSEN, A. L.; JOHNSEN, B. H.; THAYER, J. F. Vagal influence on working memory and attention. **International Journal of Psychophysiology**, v. 48, n. 3, p. 263–274, jun. 2003.
- HENLEY, J. M.; WILKINSON, K. A. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 337–350, 2016.
- HUGANIR, R. L.; NICOLL, R. A. AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. **Neuron**, v. 80, n. 3, p. 704–717, 2013.
- JAMES, W. What is an emotion? **Mind**, v. 9, p. 188–205, 1884.
- KEMP, A. H. *et al.* Impact of Depression and Antidepressant Treatment

- on Heart Rate Variability: A Review and Meta-Analysis. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 11, p. 1067–1074, jun. 2010.
- KEMP, A. H. *et al.* Depression, Comorbid Anxiety Disorders, and Heart Rate Variability in Physically Healthy, Unmedicated Patients: Implications for Cardiovascular Risk. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–8, 2012.
- KEMP, A. H.; KOENIG, J.; THAYER, J. F. From psychological moments to mortality: A multidisciplinary synthesis on heart rate variability spanning the continuum of time. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 83, n. March 2016, p. 547–567, 2017.
- KJELSTRUP, K. G. *et al.* Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 16, p. 10825–10830, 2002.
- KREIBIG, S. D. Autonomic nervous system activity in emotion: A review. **Biological Psychology**, v. 84, n. 3, p. 394–421, jul. 2010.
- KWAN, P. *et al.* Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, v. 51, n. 6, p. 1069–1077, nov. 2009.
- LABORDE, S.; MOSLEY, E.; THAYER, J. F. Heart Rate Variability and Cardiac Vagal Tone in Psychophysiological Research – Recommendations for Experiment Planning, Data Analysis, and Data Reporting. **Frontiers in Psychology**, v. 08, n. FEB, p. 1–18, 20 fev. 2017.
- LAZARUS, R. S. Thoughts on the relation between emotion and cognition. **American Psychologist**, v. 37, n. 9, p. 1019–1024, 1982.
- LEAL, R. B. *et al.* Amygdala levels of the GluA1 subunit of glutamate receptors and its phosphorylation state at serine 845 in the anterior hippocampus are biomarkers of ictal fear but not anxiety. **Molecular Psychiatry**, p. 1–11, 2018.
- LEE, H. K. *et al.* Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 955–959, 2000.
- LEVENSON, R. W. Blood, Sweat, and Fears: The Autonomic Architecture of Emotion. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1000, p. 348–366, 2003.
- LEVENSON, R. W. The autonomic nervous system and emotion. **Emotion Review**, v. 6, n. 2, p. 100–112, 2014.
- LEVENSON, R. W. **Emotion and the autonomic nervous system: a prospectus for research on autonomic specificity**, 1988.
- LEVENSON, R. W. **Autonomic and emotion**, 1994.
- LEVY, M. N. Brief Reviews: Sympathetic-Parasympathetic Interactions

in the Heart. **Circulation Research**, v. 29, n. 5, p. 437–445, 1 nov. 1971.

LOPES, M. W. *et al.* Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemical research**, v. 37, n. 9, p. 1868–78, set. 2012.

LOPES, M. W. *et al.* A single high dose of dexamethasone affects the phosphorylation state of glutamate AMPA receptors in the human limbic system. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 12, p. e986-9, 2016.

LOPES, M. W. M. W. *et al.* Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy. **Experimental Brain Research**, v. 226, n. 2, p. 153–163, 2013.

LOPES, M. W. M. W. *et al.* Region-specific alterations of AMPA receptor phosphorylation and signaling pathways in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemistry International**, v. 87, p. 22–33, 2015.

LOPES, P. *et al.* Aplicabilidade Clínica da Variabilidade da Frequência Cardíaca. **Revista Neurociências**, v. 21, n. 04, p. 600–603, 5 fev. 2014.

LOTUFO, P. A. *et al.* A systematic review and meta-analysis of heart rate variability in epilepsy and antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 53, n. 2, p. 272–282, fev. 2012.

MACLEAN, P. D. Psychosomatic Disease and the “Visceral Brain”. **Psychom. Med.**, v. 11, p. 338–353, 1949.

MAUSS, I. B. *et al.* The Tie That Binds? Coherence Among Emotion Experience, Behavior, and Physiology. **Emotion**, v. 5, n. 2, p. 175–190, 2005.

MAYER, H. *et al.* EKG abnormalities in children and adolescents with symptomatic temporal lobe epilepsy. p. 324–328, 2004.

MCCORRY, L. K. Physiology of the Autonomic Nervous System. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 71(4), n. 78, p. 1–11, 2007.

MELO, H. M. *et al.* Ultra-short heart rate variability recording reliability: The effect of controlled paced breathing. **Annals of Noninvasive Electrocardiology**, v. 4, n. 4, p. 1–9, 4 jun. 2018.

MOSER, M. B. *et al.* Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 21, p. 9697–9701, 1995.

MUJICA-PARODI, L. R. *et al.* Limbic dysregulation is associated with lowered heart rate variability and increased trait anxiety in healthy

- adults. **Human Brain Mapping**, v. 30, n. 1, p. 47–58, jan. 2009.
- MUNOZ, M. L. *et al.* Validity of (Ultra-)Short recordings for heart rate variability measurements. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–15, 2015.
- NABAVI, S. *et al.* Engineering a memory with LTD and LTP. **Nature**, v. 511, n. 7509, p. 348–52, jul. 2014.
- NAKAMURA, F. Y. *et al.* Ultra-Short-Term Heart Rate Variability is Sensitive to Training Effects in Team Sports Players. **Journal of sports science & medicine**, v. 14, n. 3, p. 602–5, 2015.
- NETO, M. A.; RASCADO, R. R.; BENDHACK, L. M. Receptores β - adrenérgicos no sistema cardiovascular. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 39, n. 1, p. 3–12, 2006.
- NILSSON, L. *et al.* Risk factors for sudden unexpected death in epilepsy: a case control study. **The Lancet**, v. 353, n. 9156, p. 888–893, 1999.
- NUNES, J. C. *et al.* Hippocampal sclerosis and ipsilateral headache among mesial temporal lobe epilepsy patients. **Seizure**, v. 20, n. 6, 2011.
- NUSSINOVITCH, U. *et al.* Reliability of ultra-short ECG indices for heart rate variability. **Annals of Noninvasive Electrocardiology**, v. 16, n. 2, p. 117–122, 2011.
- O’LEARY, O. F.; CRYAN, J. F. A ventral view on antidepressant action: roles for adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 12, p. 675–687, dez. 2014.
- OCHSNER, K. N.; GROSS, J. J. The cognitive control of emotion. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 9, n. 5, p. 242–249, 2005.
- OSÓRIO, C. M. *et al.* Mitochondrial respiratory chain complex enzyme activities of limbic structures and psychiatric diagnosis in temporal lobe epilepsy patients: Preliminary results. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 23, n. 8, p. 700–702, ago. 2017.
- PANCHANI, J. *et al.* Asymmetric hemispheric representation of periauricular heart rate modulation is individually lateralised. **Epileptic Disorders**, v. 13, n. 2, p. 172–176, 2011.
- PAPEZ, J. W. A proposed mechanism of emotion. **Arch. Neurol. Psychiatry**, v. 38, p. 725–743, 1937.
- PAULI, C. *et al.* Predictors of meaningful improvement in quality of life after temporal lobe epilepsy surgery: A prospective study. **Epilepsia**, v. 58, n. 5, p. 755–763, maio 2017a.
- PAULI, C. *et al.* Decline in word-finding: The objective cognitive finding most relevant to patients after mesial temporal lobe epilepsy surgery. **Epilepsy & Behavior**, v. 75, p. 218–224, out. 2017b.

- PAVEI, J. *et al.* Early Seizure Detection Based on Cardiac Autonomic Regulation Dynamics. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–12, 5 out. 2017.
- PEREIRA, L. A. *et al.* Assessing shortened field-based heart-rate-variability-data acquisition in team-sport athletes. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v. 11, n. 2, p. 154–158, 2016.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346–56, dez. 1977.
- PHELPS, E. A. Human emotion and memory: Interactions of the amygdala and hippocampal complex. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 14, n. 2, p. 198–202, 2004.
- RAUSCHER, G. *et al.* Sudden unexpected death in epilepsy associated with progressive deterioration in heart rate variability. **Epilepsy and Behavior**, v. 21, n. 1, p. 103–105, 2011.
- REZNIKOV, L. R. *et al.* Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: Differential effects of antidepressant treatment. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 3109–3114, 2007.
- RIBEIRO, A. L. *et al.* Desafios à implantação do centro de leitura de eletrocardiografia no ELSA-Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. suppl 2, p. 87–94, jun. 2013.
- RODRIGUES, S. M.; LEDOUX, J. E.; SAPOLSKY, R. M. The Influence of Stress Hormones on Fear Circuitry. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p. 289–313, 2009.
- RONSONI, M. F. M. F. *et al.* Mitochondrial Respiration Chain Enzymatic Activities in the Human Brain: Methodological Implications for Tissue Sampling and Storage. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 4, p. 880–891, 2016.
- RUGGIERO, R. N. *et al.* Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 44, n. 2, p. 143, 30 jun. 2011.
- RYVLIN, P. *et al.* Incidence and mechanisms of cardiorespiratory arrests in epilepsy monitoring units (MORTEMUS): A retrospective study. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 10, p. 966–977, 2013.
- SAKAKI, M. *et al.* Heart rate variability is associated with amygdala functional connectivity with MPFC across younger and older adults. **NeuroImage**, v. 139, p. 44–52, 2016.
- SCHACHTER, S.; SINGER, J. Cognitive, social, and physiological determinants of emotional state. **Psychological Review**, v. 69, n. 5, p.

379–399, 1962.

SCORZA, F. A. *et al.* The brain-heart connection: implications for understanding sudden unexpected death in epilepsy. **Cardiol.J**, v. 16, n. 5, p. 394–399, 2009.

SHAFFER, J. Neuroplasticity and clinical practice: Building brain power for health. **Frontiers in Psychology**, v. 7, n. JUL, p. 1–12, 2016.

SHEKHAR, A. *et al.* The Amygdala, Panic Disorder, and Cardiovascular Responses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 985, n. 1, p. 308–325, 24 jan. 2006.

SHOEMAKER, J. K. *et al.* Forebrain organization for autonomic cardiovascular control. **Autonomic Neuroscience**, v. 188, p. 5–9, mar. 2015.

SMITH, C. A.; LAZARUS, R. S. Appraisal components, core relational themes, and the emotions. **Cognition & Emotion**, v. 7, n. 3–4, p. 233–269, 1993.

SPENCER, S. S. When should temporal-lobe epilepsy be treated surgically? **Lancet Neurology**, v. 1, n. 6, p. 375–382, 2002.

SUORSA, E. *et al.* Heart rate dynamics in temporal lobe epilepsy-A long-term follow-up study. **Epilepsy Research**, v. 93, n. 1, p. 80–83, 2011.

SURGES, R. *et al.* Sudden unexpected death in epilepsy: risk factors and potential pathomechanisms. **Nature Reviews Neurology**, v. 5, n. 9, p. 492–504, 11 set. 2009a.

SURGES, R. *et al.* Do alterations in inter-ictal heart rate variability predict sudden unexpected death in epilepsy? **Epilepsy Research**, v. 87, n. 2–3, p. 277–280, dez. 2009b.

SZTAJZEL, J. Heart rate variability: A noninvasive electrocardiographic method to measure the autonomic nervous system. **Swiss Medical Weekly**, v. 134, n. 35–36, p. 514–522, 2004.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **European Heart Journal**, v. 17, p. 354–381, 1996.

THAYER, J. F. *et al.* Heart rate variability, prefrontal neural function, and cognitive performance: The neurovisceral integration perspective on self-regulation, adaptation, and health. **Annals of Behavioral Medicine**, v. 37, n. 2, p. 141–153, 2009.

THAYER, J. F. *et al.* A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: Implications for heart rate variability as a marker of stress and health. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36,

n. 2, p. 747–756, 2012.

THAYER, J. F.; BROSSCHOT, J. F. Psychosomatics and psychopathology: looking up and down from the brain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 10, p. 1050–8, nov. 2005.

THAYER, J. F.; LANE, R. D. A model of neurovisceral integration in emotion regulation and dysregulation. **Journal of affective disorders**, v. 61, n. 3, p. 201–16, dez. 2000.

THAYER, J. F.; LANE, R. D. Claude Bernard and the heart-brain connection: further elaboration of a model of neurovisceral integration. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 33, n. 2, p. 81–8, fev. 2009.

THAYER, J. F.; YAMAMOTO, S. S.; BROSSCHOT, J. F. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. **International journal of cardiology**, v. 141, n. 2, p. 122–31, 28 maio 2010.

THONG, T. *et al.* Accuracy of ultra-short heart rate variability measures. **Proceedings of the 25th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE Cat. No.03CH37439)**, v. 3, p. 2424–2427, 2003.

TOMSON, T. *et al.* Sudden Unexpected Death in Epilepsy: A Review of Incidence and Risk Factors. **Epilepsia**, v. 46, n. s11, p. 54–61, dez. 2005.

TOMSON, T.; NASHEF, L.; RYVLIN, P. Sudden unexpected death in epilepsy: current knowledge and future directions. **The Lancet Neurology**, v. 7, n. 11, p. 1021–1031, 2008.

TOOBY, J.; COSMIDES, L. The past explains the present: Emotional Adaptations and the Structure of Ancestral. **Ethology and Sociobiology**, v. 11, n. 4–5, p. 375–424, 1990.

TRAUTWEIN, W.; CAVALIÉ, A. Cardiac calcium channels and their control by neurotransmitters and drugs. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 6, n. 6, p. 1409–1416, dez. 1985.

VANDERLEI, L. C. M. *et al.* Comparison of the Polar S810i monitor and the ECG for the analysis of heart rate variability in the time and frequency domains. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 41, n. 10, p. 854–9, 2008.

VANDERLEI, L. C. M. *et al.* Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Rev bras Cir Cardiovasc**, v. 24, n. 2, p. 205–217, 2009.

VELASCO, T. R. *et al.* Utility of Ictal Single Photon Emission Computed Tomography in Mesial Temporal Lobe Epilepsy With Hippocampal Atrophy: A Randomized Trial. **Neurosurgery**, v. 68, n. 2,

p. 431–436, fev. 2011.

WANG, J. Q. *et al.* Roles of subunit phosphorylation in regulating glutamate receptor function. **European Journal of Pharmacology**, v. 728, n. 1, p. 183–187, 2014.

WHITEHEAD, G. *et al.* Acute stress causes rapid synaptic insertion of Ca²⁺-permeable AMPA receptors to facilitate long-term potentiation in the hippocampus. **Brain : a journal of neurology**, v. 136, n. Pt 12, p. 3753–3765, 2013.

WHITLOCK, J. R. *et al.* Learning Induces Long Term Potentiation in the Hippocampus. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1093–1097, 2006.

WIEBE, S. *et al.* A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. **The New England journal of medicine**, v. 345, n. 5, p. 311–8, ago. 2001.

WOOLFREY, K. M.; DELL'ACQUA, M. L. Coordination of Protein Phosphorylation and Dephosphorylation in Synaptic Plasticity. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 48, p. 28604–12, 2015.

ZIGMOND, A. S.; SNAITH, R. P. The hospital anxiety and depression scale. **Acta psychiatrica Scandinavica**, v. 67, n. 6, p. 361–70, jun. 1983.

APÊNDICE A – Parecer do comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UFSC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Pesquisador: Roger Walz

Título da Pesquisa: MARCADORES DE POTENCIAÇÃO SINÁPTICA E MECANISMOS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NA EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL ASSOCIADA À ESCLEROSE DO HIPOCAMPO

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina
Versão: 2

CAAE: 09946012.0.0000.0121

Área Temática:

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Número do Parecer: 242.999

Data da Relatoria: 08/04/2013

DADOS DO PARECER

O projeto MARCADORES DE POTENCIAÇÃO SINÁPTICA E MECANISMOS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NA EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL ASSOCIADA À ESCLEROSE DO HIPOCAMPO tem como objetivo estudar mecanismos neuroquímicos envolvidos com a potenciação sináptica e vias de transdução de sinal no tecido obtido durante as cirurgias de epilepsia. São sujeitos da pesquisa 80 pacientes com ELT-EH consecutivos submetidos à lobectomia temporal anterior-mesial para tratamento de epilepsia de difícil controle no Centro de Cirurgia de Epilepsia do Estado de Santa Catarina (CEPESC) no Hospital Governador Celso Ramos.

Apresentação do Projeto:

Objetivo Geral:

Estudar os marcadores de potenciação e despotenciação sináptica e mecanismos de transdução de sinal associados à epilepsia de lobo temporal associada à esclerose do hipocampo (ELTM-EH).

Objetivos específicos do estudo em pacientes:

- Determinar os níveis de fosforilação da Ser831 e defosforilação da Ser845 do carbono terminal da subunidade GluA1 do receptor AMPA no hipocampo e córtex de pacientes portadores de ELT-EH tratados cirurgicamente;
- Quantificar através de imunodeteção os níveis de PKA, MAPK, CamKII e PKC totais e ativadas no hipocampo e córtex de pacientes portadores de ELT-EH tratados cirurgicamente;
- Avaliar a expressão de PKA, MAPK, CamKII e PKC totais e ativadas nas diferentes sub-regiões do hipocampo e neocórtex de pacientes portadores de ELT-EH tratados cirurgicamente;
- Correlacionar os achados dos itens 1, 2 e 3 com variáveis demográficas, clínicas, eletrofisiológicas, neuroimagem estrutural, neuroimagem funcional, aspectos neuropsicológicos, psiquiátricos e resposta ao tratamento cirúrgico de pacientes com ELTM-EH.

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFSC em 30 de novembro de 2009. O pesquisador responsável solicita a "a prorrogação do projeto" por um período de três anos a partir de novembro de 2012. Ele declara que "Na primeira etapa do projeto foram obtidas as amostras biológicas de tecido cerebral dos pacientes submetidos à cirurgia de epilepsia". A prorrogação do projeto visa a realização da "fase de análise bioquímica das amostras biológicas conforme a metodologia prevista no projeto" e "também permitirá a inclusão de casos adicionais com intuito de aumentar a amostra de pacientes". Registra -se que "não serão realizadas modificações nos objetivos e metodologia do projeto apresentado originalmente". Solicita-se a prorrogação por um período de 3 anos a partir de novembro de 2012, mês em que expirou a validade do projeto. Foram anexados na Plataforma Brasil os seguintes documentos: Cronograma reformulado; TCLE;

Declaração do Pesquisador responsável; Folha de Rosto da CONEP; Certificado de aprovação do projeto emitido pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da UFSC. De acordo com o pesquisador responsável, a prorrogação visa a realização de etapas de análise já previstas no projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Recomendações: Recomenda-se a aprovação da emenda pelo Comitê de Ética.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANOPOLIS, 10 de Abril de 2013

**Assinador por: Andréa Ferreira Delgado
(Coordenador)**

E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-900

Telefone: (48)3721-9206

UF: SC Município: FLORIANOPOLIS

Fax: (48)3721-969

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido



UFSC

Universidade Federal de Santa Catarina
Hospital Universitário (HU-UFSC)
Campus Universitário - Trindade - Florianópolis-SC

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: MARCADORES DE POTENCIAÇÃO SINÁPTICA E MECANISMOS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NA EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL ASSOCIADA À ESCLEROSE DO HIPOCAMPO

Eu, _____, _____ anos, concordo em participar no projeto de pesquisa conduzido por Dr. Roger Walz, Dr. Marcelo Neves Linhares, Dr. Rodrigo Leal, Dr. Ricardo Guarnieri, Dra. Kátia Lin. Este projeto de pesquisa tem como objetivo estudar os marcadores de potenciação e despotenciação sináptica e os mecanismos de transdução de sinal associados à epilepsia de lobo temporal associada à esclerose do hipocampo (ELTM-EH). Este estudo será realizado no hipocampo e neocórtex de pacientes com ELTM-EH, com epilepsia de difícil controle, que foram submetidos a lobectomia temporal anterior-mesial. Este procedimento já é mundialmente reconhecido, beneficiando mais de 70% dos pacientes com ELTM-EH.

Procedimento a ser seguido:

Protocolo de avaliação pré-cirúrgica do CEPESC, semelhante ao previamente descrito na literatura, incluindo vídeo-eletroencefalograma (VEEG), ressonância nuclear magnética (RNM), avaliação neuropsicológica, psiquiátrica e social. A técnica cirúrgica de lobectomia temporal anterior-mesial clássica consiste na retirada do hipocampo (HIP), parte da amígdala e neocórtex temporal no limite posterior de até 4 cm do polo temporal. Após a craniotomia, abertura da meninge e delimitação da área de ressecção serão obtidas amostras do terço anterior e no limite posterior da ressecção do neocórtex temporal, parte da cabeça do hipocampo e metade da amígdala, já rotineiramente

ressecados para o tratamento. O restante do material (neocórtex e corpo e cauda do hipocampo) será enviado para estudo anatomopatológico de rotina, incluindo avaliação da perda neuronal e brotamentos sinápticos no hipocampo além dos estudos de imunoistoquímica deste projeto.

As amostras coletadas durante a cirurgia, serão congeladas em nitrogênio líquido e depois transferidas para Freezer -70°C onde permanecerão armazenadas até a realização dos estudos neuroquímicos.

Serão coletadas amostras de neocórtex temporal de um paciente, que após homogeneização, serão divididas em várias alíquotas que servirão de controle interno para os experimentos de neuroquímica realizados em dias diferentes, evitando assim variações intrínsecas ocorridas pela realização dos ensaios em dias diferentes. O mesmo será realizado no caso das reações de imunoistoquímica.

Todas as variáveis relacionadas ao procedimento cirúrgico e anestésico serão controladas e os procedimentos realizados sistematicamente de forma semelhante em cada um dos pacientes através de protocolo pré-estabelecido.

Riscos e desconfortos:

Quanto aos riscos relacionados à obtenção das amostras, há indicação de tratamento cirúrgico destes pacientes, com remoção dos tecidos envolvidos, não havendo danos adicionais para o paciente

Custo: Não haverá custo para os pacientes que participarem deste projeto de pesquisa.

Sigilo: Toda informação obtida não será fornecida a pessoas não envolvidas neste projeto de pesquisa sem consentimento. Seu nome jamais será utilizado em trabalhos científicos ou apresentações em congressos/simpósios, ou seja, fica assegurado o anonimato da identidade. Liberdade do paciente: A participação neste projeto de pesquisa é voluntária e o paciente não receberá nenhuma remuneração. O paciente poderá recusar-se a participar ou retirar-se do projeto em qualquer momento sem penalidades ou suspensão do acompanhamento médico.

Consentimento pós esclarecimento: Declaro que _____ me esclareceu sobre todos os itens acima. Eu livremente concordo em participar deste projeto de pesquisa e declaro que recebi uma cópia deste consentimento. Caso eu necessite de qualquer informação adicional sobre a minha participação neste projeto eu poderei contatar o Dr. Roger Walz.

Voluntário (nome, assinatura e data)

Pesquisador Responsável (nome, assinatura e data)

Testemunha da assinatura voluntária do paciente

APÊNDICE C – Questionário de variáveis clínicas e operatórias

Nome do Paciente:

Sexo: () M () F Registro:

Data de Nascimento: Data da Cirurgia: Peso:

PRÉ-OPERATÓRIO

Carbamazepina () Horários

querecebeu: _____

Fenitoína () Horários que

recebeu: _____

–

Fenobarbital () Horários que

recebeu: _____

Ácido Valpróico Horários que

recebeu: _____

Hidantalização na noite anterior () Sim 20 mg/kg () Não -Usava
Hidantal - 250mg noite anterior

Dexametasona 10 mg () Kefazol 1 grama () ou outro ATB
_____ dose: _____

Propofol 2 mg/kg () sim () não Outra dose ?

Rocurônio – 0,5 a 0,9 mg/kg () sim () não Fentanil 1-2
mg/kg () sim () não

MANUTENÇÃO: SF 0.9% 1,2 ml/kg/h + ½ da diurese Remifentanil
0,1 - 0,2 ug/km/min Isoflurano 0,5- 0,6 CAM

Horário da Indução Anestésica: _____

Horário da Abertura da Duramáter: _____

Horário da Retirada de Neocorte _____

Horário da Coagulação vasos do HIP: _____ Horário da Retirada do HIP _____ Horário da retirada da AMI _____ Horário da Coleta da Gasometria: _____ Horário da realização da Gasometria: _____ Coleta Gaso: _____ Realização: _____																
DATA Última Aura: _____ Penúltima Aura: _____ Última Crise Parcial Complexa: _____ Penúltima Crise Parcial Complexa: _____ Início da Última Menstruação: _____ Término da Última Menstruação: _____																
GASOMETRIA Coagulação dos Vasos do Hipocampo PAM: _____ FC: _____ FR: _____ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <tr><td style="padding: 2px;">pH</td><td style="padding: 2px;">Glicose</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">PCO2</td><td style="padding: 2px;">Na⁺</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">PO2</td><td style="padding: 2px;">K⁺</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">HCO3</td><td style="padding: 2px;">Ca²⁺</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">CO2Total</td><td style="padding: 2px;">Cl⁻</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">E.B.</td><td style="padding: 2px;">Mg²⁺</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Sat O2</td><td style="padding: 2px;">Ht</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">Ác. Lático</td><td style="padding: 2px;">Hb</td></tr> </table>	pH	Glicose	PCO2	Na ⁺	PO2	K ⁺	HCO3	Ca ²⁺	CO2Total	Cl ⁻	E.B.	Mg ²⁺	Sat O2	Ht	Ác. Lático	Hb
pH	Glicose															
PCO2	Na ⁺															
PO2	K ⁺															
HCO3	Ca ²⁺															
CO2Total	Cl ⁻															
E.B.	Mg ²⁺															
Sat O2	Ht															
Ác. Lático	Hb															
HORA Última Aura: _____ Penúltima Aura: _____ Última Crise Parcial Complexa: _____ Penúltima Crise Parcial Complexa: _____ Usa ACO () Sim () Não Qual o ACO? _____																

ANEXO A – Escala de ansiedade e depressão hospitalar

Este questionário ajudará o seu médico a saber como você está se sentindo. Leia todas as frases. Marque com um "X" a resposta que melhor corresponder a como você tem se sentido na ÚLTIMA SEMANA. Não é preciso ficar pensando muito em cada questão. Neste questionário as respostas espontâneas têm mais valor do que aquelas em que se pensa muito. Marque apenas uma resposta para cada pergunta.

A 1. Eu me sinto tenso ou contraído:

- 3 () A maior parte do tempo
2 () Boa parte do tempo
1 () De vez em quando
0 () Nunca

D 2. Eu ainda sinto gosto pelas mesmas coisas de antes:

- 0 () Sim, do mesmo jeito que antes
1 () Não tanto quanto antes
2 () Só um pouco
3 () Já não sinto mais prazer em nada

A 3. Eu sinto uma espécie de medo, como se alguma coisa ruim fosse acontecer:

- 3 () Sim, de um jeito muito forte
2 () Sim, mas não tão forte
1 () Um pouco, mas isso não me preocupa
0 () Não sinto nada disso

D 4. Dou risada e me divirto quando vejo coisas engraçadas:

- 0 () Do mesmo jeito que antes
1 () Atualmente um pouco menos
2 () Atualmente bem menos
3 () Não consigo mais

A 5. Estou com a cabeça cheia de preocupações:

- 3 () A maior parte do tempo
2 () Boa parte do tempo
1 () De vez em quando
0 () Raramente

D 6. Eu me sinto alegre:

- 3 () Nunca
2 () Poucas vezes
1 () Muitas vezes
0 () A maior parte do tempo

A 7. Consigo ficar sentado à vontade e me sentir relaxado:

- 0 () Sim, quase sempre
1 () Muitas vezes
2 () Poucas vezes
3 () Nunca

D 8. Eu estou lento para pensar e fazer as coisas:

- 3 () Quase sempre
2 () Muitas vezes
1 () De vez em quando
0 () Nunca

A 9. Eu tenho uma sensação ruim de medo, como um frio na barriga ou um aperto no estômago:

- 0 () Nunca
1 () De vez em quando
2 () Muitas vezes
3 () Quase sempre

D 10. Eu perdi o interesse em cuidar da minha aparência:

- 3 () Completamente
2 () Não estou mais me cuidando como deveria
1 () Talvez não tanto quanto antes
0 () Me cuido do mesmo jeito que antes

A 11. Eu me sinto inquieto, como se eu não pudesse ficar parado em lugar nenhum:

- 3 () Sim, demais
2 () Bastante
1 () Um pouco
0 () Não me sinto assim

D 12. Fico esperando animado as coisas boas que estão por vir:

- 0 () Do mesmo jeito que antes
1 () Um pouco menos do que antes
2 () Bem menos do que antes
3 () Quase nunca

A 13. De repente, tenho a sensação de entrar em pânico:

- 3 () A quase todo momento
2 () Várias vezes
1 () De vez em quando
0 () Não sinto isso

D 14. Consigo sentir prazer quando assisto a um bom programa de televisão, rádio ou quando leio alguma coisa:

- 0 () Do mesmo jeito que antes
1 () Um pouco menos do que antes
2 () Bem menos do que antes
3 () Quase nunca

Passa para o próximo questionário (página seguinte).

A:

D: