

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Hanna Lury Umezu

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RESPIRATÓRIA
E CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS
POR PTZ EM RATOS WISTAR ADULTOS**

Belo Horizonte

2024

Hanna Lury Umezu

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RESPIRATÓRIA
E CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS
POR PTZ EM RATOS WISTAR ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Victor Rodrigues Santos

Belo Horizonte

2024

043

Umezu, Hanna Lury.

Avaliação da atividade respiratória e crises convulsivas induzidas por PTZ em ratos Wistar adultos [manuscrito] / Hanna Lury Umezu. – 2024.

87 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva. Co-orientador: Prof. Dr. Victor Rodrigues Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Respiração. 3. Apneia. 4. Epilepsia. 5. Diafragma. 6. Hipercapnia. 7. Pentilenotetrazol. I. Silva, Glauber dos Santos Ferreira da. II. Santos, Victor Rodrigues. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
FOLHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 584 DE
HANNA LURY UMEZU

“Avaliação da Atividade Respiratória e Crises Convulsivas Induzidas por PTZ em Ratos Wistar Adultos”

HANNA LURY UMEZU

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 16 de fevereiro de 2024, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dra. Mirela Barros Dias - IBB/UNESP

Profa. Dra. Andrea Siqueira Haibara - ICB/UFMG

Prof. Dr. Victor Rodrigues Santos - ICB/UFMG - Co-orientador

Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva - ICB/UFMG - Orientador



Documento assinado eletronicamente por **Glauber dos Santos Ferreira da Silva**, Professor do Magistério Superior, em 28/02/2024, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Victor Rodrigues Santos, Professor(a)**, em 28/02/2024, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto no 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Siqueira Haibara**, Professora do Magistério Superior, em 29/02/2024, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Mirela Barros Dias**, Usuária Externa, em 05/03/2024, às 16:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto no 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3054918** e o código CRC **A0846FB4**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 584 DE
HANNA LURY UMEZU

Às 14:00 horas do dia 16 do mês de fevereiro de 2024, realizou-se de forma híbrida a sessão pública para a defesa da Dissertação de Hanna Lury Umezú, presencialmente na Sala Wilson Beraldo (A4-175) - ICB/UFMG, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG e on line através da plataforma microsoft Teams. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva**, ICB/UFMG - orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dra. Mirela Barros Dias**, IBB/UNESP, **Profa. Dra. Andrea Siqueira Haibara**, ICB/UFMG, **Prof. Dr. Victor Rodrigues Santos**, ICB/UFMG - coorientador, e Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva, ICB/UFMG - orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Avaliação da Atividade Respiratória e Crises Convulsivas Induzidas por PTZ em Ratos Wistar Adultos**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 16 de fevereiro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Glauber dos Santos Ferreira da Silva**, Professor do Magistério Superior, em 28/02/2024, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Victor Rodrigues Santos, Professor(a)**, em 28/02/2024, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto no 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Siqueira Haibara**, Professora do Magistério Superior, em 29/02/2024, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Mirela Barros Dias**, Usuária Externa, em 05/03/2024, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto no 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3054913** e o código CRC **70F61DD8**

À minha família

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Elisa e Elcio, que sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial, até quando nem eu mesma acreditava. Muitas vezes não conseguimos expressar ao máximo, ou da melhor forma possível, o que sentimos. Porém, saibam que vocês tornaram essa jornada muito mais sustentável, desde as breves ligações de vídeo, até os conselhos de vida que levarei comigo para sempre.

Agradeço ao meu orientador, ou melhor, mentor Prof. Glauber da Silva, que me acolheu em 2019 e desde aquela época me ensina a como fazer ciência com qualidade. Também agradeço a confiança que depositou em mim, por acreditar no meu potencial e por me ajudar a chegar até aqui.

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Victor Santos, pela introdução a esse tópico que tanto me intriga e pelas conversas.

Agradeço ao meu parceiro, Vinícius. O apoio que você me deu, e continua dando, é uma das coisas mais valiosas para mim. Obrigada por se fazer presente em todos os pontos da minha vida.

Agradeço à Bia, minha maior companheira de lab. Apesar de estar distante nesse momento, saiba que as incansáveis horas passadas dentro e fora do lab foram muitas vezes o meu acalento.

Agradeço aos meus colegas da Endócrino, pelas risadas e momentos de descontração durante épocas de experimentos intensos e falhos.

Agradeço a todos os servidores, técnicos e colaboradores da UFMG, que realizaram um trabalho tão fundamental para que todo esse trabalho fosse concluído.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, que fomentou minha bolsa de mestrado durante esse período.

Agradeço às outras agências de fomento, CNPq e FAPEMIG (Edital Demanda Universal 001/2021 APQ00779-21), que também financiaram esse trabalho.

Resumo

A epilepsia é uma doença neurológica caracterizada pela ocorrência espontânea e recorrente de crises epiléticas. Ela é altamente prevalente no mundo e um terço dos pacientes é refratário ao tratamento farmacológico. Dentre esses pacientes, a principal causa de morte é a SUDEP (*Sudden Unexpected Death in Epilepsy*), que apresenta como causa da morte uma parada respiratória após um evento de crise. Além disso, já foi observado que pacientes com epilepsia apresentam uma atenuação da resposta ventilatória ao CO₂, o que pode contribuir para a falha respiratória associada a um evento de crise. Diante disso, esse estudo foi dividido em duas partes, uma que envolveu a avaliação da atividade respiratória durante crises agudas induzidas por PTZ (pentilenotetrazol), e outra que avaliou a resposta ventilatória à hipercapnia após crises repetidas induzidas cronicamente por PTZ. A primeira parte do estudo investigou a atividade respiratória em ratos *Wistar* adultos em diferentes graus de severidade de crises comportamentais. Os animais foram submetidos a cirurgia para implantação de eletrodos no córtex e músculo diafragma, permitindo registros simultâneos de eletroencefalograma (EEG) e eletromiograma (DIA_{EMG}), e a atividade respiratória (frequência respiratória e amplitude máxima do diafragma) foi avaliada com base no DIA_{EMG}. As crises foram induzidas agudamente através de injeção de PTZ em diferentes doses. A classificação das crises foi baseada em uma tabela pré-estabelecida, com crises do tipo ausência representando o escore mais baixo e crises tônico-clônicas como as mais severas. A atividade respiratória foi agrupada nos diferentes graus de severidade das crises. Durante as crises do tipo ausência e *jerks* mioclônicos, a frequência respiratória diminuiu significativamente (~50% de redução) em comparação com os períodos pré e pós-ictais. Mudanças pronunciadas ocorreram com crises mais graves (clônicas e tônicas) com períodos de apneia, especialmente durante crises tônicas. A duração da apneia foi significativamente maior em crises tônicas em comparação com as clônicas. Notavelmente, durante convulsões tônicas induzidas por PTZ, os eventos de apneia foram marcados por contração tônica do DIA_{EMG} (apneia da fase tônica). Na maioria dos animais (5 em 7), este foi um evento fatal em que a parada respiratória causada pela crise precedeu a assistolia. Em conclusão, fornecemos a primeira avaliação sistemática da atividade respiratória nas crises agudas induzidas por PTZ e mostramos que a disfunção respiratória é mais pronunciada em crises com maior gravidade. A segunda parte do estudo investigou a resposta ventilatória em ratos *Wistar* adultos após crises convulsivas repetidas induzidas por PTZ. As crises foram induzidas (com uma dose i.p. de 40 mg/kg) em dias alternados, totalizando 10 injeções. Após três crises consecutivas de escore alto e após o término do tratamento, a resposta ventilatória a 7% CO₂ foi avaliada. Depois de três crises severas consecutivas, não observamos diferença na ventilação comparado com o grupo controle. Porém, após a 10^a injeção de PTZ, observamos uma atenuação da ventilação nos animais que apresentaram crises recorrentes, e essa diminuição foi devida a um menor aumento da frequência respiratória. Portanto, as crises repetidas induzidas cronicamente por PTZ promovem uma atenuação da resposta ventilatória à hipercapnia.

PALAVRAS-CHAVE: Respiração, PTZ, apneia, epilepsia, SUDEP, diafragma, quimiorrecepção, hipercapnia, ventilação

Abstract

Epilepsy is a neurological disorder characterized by the spontaneous and recurrent occurrence of epileptic seizures. It is highly prevalent worldwide, and one-third of patients are refractory to pharmacological treatment. Among these patients, the leading cause of death is SUDEP (Sudden Unexpected Death in Epilepsy), which is attributed to respiratory arrest following a seizure event. Additionally, it has been observed that epilepsy patients exhibit a blunted ventilatory response to CO₂, which may contribute to respiratory failure associated with a seizure event. In light of this, this study was divided into two parts, one involving the assessment of respiratory activity during acute seizures induced by PTZ (pentylentetrazole) and another evaluating the ventilatory response to hypercapnia after chronically induced repeated seizures by PTZ. The first part of the study investigated respiratory activity in adult Wistar rats at different levels of behavioral seizure severity. Animals underwent surgery for electrode implantation in the cortex and diaphragm muscle, allowing simultaneous recordings of electroencephalogram (EEG) and diaphragmatic electromyogram (DIA_{EMG}). Respiratory activity (respiratory frequency and maximum diaphragmatic amplitude) was assessed based on DIA_{EMG}. Seizures were acutely induced by PTZ injection at different doses, and their severity was classified based on a pre-established table, with absence seizures representing the lowest score and tonic-clonic seizures as the most severe. Respiratory activity was grouped into different levels of seizure severity. During absence seizures and myoclonic jerks, respiratory frequency significantly decreased (~50% reduction) compared to pre-ictal and post-ictal periods. Pronounced changes occurred with more severe seizures (clonic and tonic), including periods of apnea, especially during tonic seizures. Apnea duration was significantly longer in tonic seizures compared to clonic seizures. Notably, during PTZ-induced tonic seizures, apnea events were marked by tonic contraction of DIA_{EMG} (tonic phase apnea). In most animals (5 out of 7), this was a fatal event where respiratory arrest caused by the seizure preceded asystole. In conclusion, we provide the first systematic assessment of respiratory activity in acute seizures induced by PTZ and demonstrate that respiratory dysfunction is more pronounced in more severe seizures. The second part of the study investigated ventilatory response in adult Wistar rats after repeated convulsive seizures induced by PTZ. Seizures were induced (with an i.p. dose of 40 mg/kg) on alternate days, totaling 10 injections. After three consecutive high-scoring seizures and at the end of the treatment, ventilatory response to 7% CO₂ was assessed. After three consecutive severe seizures, no difference in ventilation was observed compared to the control group. However, after the 10th PTZ injection, an attenuation of ventilation was observed in animals with recurrent seizures, and this decrease was due to a lower increase in respiratory frequency. Therefore, chronically induced repeated seizures by PTZ promote an attenuation of ventilatory response to hypercapnia.

KEY-WORDS: Breathing, PTZ, apnea, epilepsy, SUDEP, diaphragm, chemoreception, hypercapnia, ventilation

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Esquema de um corte sagital do tronco encefálico de um rato.....	21
Figura 1.2 - Figura esquemática da rede respiratória	22
Figura 1.3 - Ordem de eventos na SUDEP	26
Figura 4.1 - Eletrodos de EEG e EMG	35
Figura 4.2 - Protocolo experimental	36
Figura 4.3 - Desenho esquemático dos períodos analisados	38
Figura 5.1 - Efeito das injeções de salina e de PTZ	42
Figura 5.2 - Escore e Latência	43
Figura 5.3 - Crises do Tipo Ausência diminuem a atividade respiratória	45
Figura 5.4 - <i>Jerks</i> mioclônicos e a atividade respiratória	47
Figura 5.5 - Crises clônicas aumentam o DIA _{EMG} Peak Amp e diminuem a FR	49
Figura 5.6 - Crises tônico-clônicas e eventos de apneia.....	51
Figura 5.7 - Crises tônico-clônicas fatais vs não-fatais	52
Figura 6.1 - Protocolos de crises repetidas e da Ventilação	56
Figura 6.2 - Traçado representativo da ventilação	56
Figura 7.1 - Ventilação após três crises severas consecutivas.....	58
Figura 7.2 - Ventilação após a última injeção de PTZ	60

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 - Escores das crises convulsivas	37
---	----

Lista de Abreviaturas

BötC: Complexo de Bötzinger

CEBIO: Centro de Bioterismo

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CO₂: Gás carbônico

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CRV: Coluna respiratória ventral

cVRG: Grupo ventral respiratório caudal

DFIB: Departamento de Fisiologia e Biofísica

DIA_{EMG} Peak Amp: Pico da amplitude do eletromiograma do diafragma

DIA_{EMG}: Eletromiograma do Diafragma

DV: Dorso-ventral

EEG: Eletroencefalograma

EMG: Eletromiograma

EMUs: Epilepsy Monitoring Units

EPM: Erro Padrão Da Média

FR: Frequência Respiratória

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GRD: Grupamento Respiratório Dorsal

GRP: Grupo Respiratório Pontino

HCVR: Resposta Ventilatória à Hipercapnia

i.m.: Intramuscular

i.p.: Intraperitoneal

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

KF: Núcleo Kölliker-Fuse

LC: Locus Coeruleus

N₂: Nitrogênio

NA: Núcleo Ambiguos

NTS: Núcleo do Trato Solitário

O₂: Oxigênio

PB: Núcleo Parabraquial

PCO₂: Pressão parcial de gás carbônico

pFRG: Grupamento Parafacial

PO₂: Pressão parcial de oxigênio

preBötC: Complexo pré-Bötzinger

PTZ: Pentilenotetrazol

RTN: Núcleo Retrotrapezóide

rVRG: Grupo Ventral Respiratório Rostral

s.c.: Subcutâneo

SD: Spreading Depolarization

SUDEP: Sudden Unexpected Death in Epilepsy

SWD: Spike Wave Discharge

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

\dot{V}_E : Ventilação

V_T: Volume Corrente

WAR: Wistar Audiogenic Rat

Sumário

1. Introdução	18
1.1. Controle neural da respiração	19
1.2. Epilepsia.....	23
1.3. Efeitos de crises convulsivas na respiração	24
1.4. Modelos animais para o estudo de crises.....	26
2. Justificativa	28
3. Objetivos.....	30
3.1. Objetivo geral – <i>Crises Agudas</i>	31
3.1.1. Objetivo específico 1	31
3.1.2. Objetivo específico 2	31
3.2. Objetivo geral – <i>Crises Repetidas</i>	31
3.2.1. Objetivo específico 1	31
3.2.2. Objetivo específico 2	31
4. Materiais e Métodos – <i>Crises Agudas</i>.....	32
4.1. Animais experimentais e Aprovação do Comitê de Ética	33
4.2. Cirurgia para implante dos eletrodos	33
4.2.1. Implante de eletrodos de EMG.....	34
4.2.2. Implante de eletrodos de EEG.....	34
4.3. Registro de EEG e EMG.....	35
4.4. Droga	35
4.5. Protocolo experimental	36
4.6. Análise dos dados e Estatística	37
5. Resultados – <i>Crises Agudas</i>	40
5.1. Efeitos das injeções de salina e de PTZ na atividade respiratória	41
5.2. Efeito de diferentes doses de PTZ no escore de crise e na latência.....	43
5.3. Crises do Tipo Ausência diminuem a atividade respiratória	44
5.4. <i>Jerks</i> mioclônicos e a atividade respiratória	46
5.5. Crises clônicas aumentam o DIA _{EMG} Peak Amp e diminuem a FR	48
5.6. Crises tônico-clônicas e eventos de apneia.....	50
6. Materiais e Métodos – <i>Crises Repetidas</i>	53
6.1. Animais experimentais e Aprovação do Comitê de Ética	54
6.2. Medida de ventilação pulmonar (pletismografia de corpo inteiro).....	54
6.3. Protocolo de indução de crises repetidas	54

6.4. Protocolo das ventilações e exposição à hipercapnia	55
6.5. Análise dos dados e Estatística	56
7. Resultados – Crises Repetidas	57
7.1. Resposta à hipercapnia após três crises consecutivas de escore 5	58
7.2. Resposta à hipercapnia após as dez injeções de PTZ	59
8. Discussão	61
9. Conclusões	68
10. Referências Bibliográficas	70
Anexo	76

1. Introdução

1.1. Controle neural da respiração

A respiração desempenha um papel crucial no organismo, sendo o processo responsável por conduzir o ar para dentro e para fora dos pulmões de forma rítmica. A função primordial é realizar as trocas gasosas entre os meios externo e o interno, visando remover o excesso de gás carbônico (CO_2), derivado do metabolismo, ao mesmo tempo que supre a demanda por oxigênio (O_2). Essencialmente, a respiração pode ser dividida em quatro etapas:

1. Ventilação: processo de troca de ar entre a atmosfera e os pulmões. É um processo de convecção, que ocorre devido a diferença de pressão entre os meios interno e externo;
2. Difusão I: processo de trocas gasosas entre os pulmões e o sangue;
3. Transporte: processo de transportar O_2 e CO_2 pelo sangue;
4. Difusão II: processo de trocas gasosas entre o sangue e as células.

Apesar de, isoladamente, esses processos aparentarem ser simples, o funcionamento concomitante e sincronizado deles compõe um sistema complexo e robusto, uma vez que existe a necessidade constante de manter a homeostase dos gases sanguíneos, ao mesmo tempo que atende a diferentes demandas metabólicas e comportamentais, tais como a fonação, mastigação, deglutição, locomoção e exercício físico [1,2]. Essa coordenação de eventos é realizada basicamente por três componentes: *i*) sensores, que fornecem informações aferentes de mecano e quimiorreceptores; *ii*) controlador central, que envolve os geradores de ritmo e de padrão respiratório e; *iii*) músculos efetores respiratórios, que recebem informações eferentes do controlador central [3].

Os sensores do sistema respiratório são divididos entre mecanorreceptores, que monitoram o *status* das vias aéreas, pulmões, tórax e músculos respiratórios, e quimiorreceptores, tanto periféricos quanto centrais. Os mecanorreceptores podem ser agrupados em quatro categorias distintas, sendo que cada uma desencadeia uma resposta diferente [4]. Há os receptores de estiramento, responsáveis por desencadear o reflexo de Breuer-Hering, o que impede a inflação excessiva dos pulmões; há receptores sob o epitélio, que respondem a diferentes estímulos mecânicos e químicos e desencadeiam reflexos protetivos, como o da tosse e do espirro; há alguns receptores que respondem a danos teciduais e se assemelham funcionalmente a nociceptores; e, por fim, há também receptores especializados para fornecer um *feedback* da deglutição e sabor [4].

Os quimiorreceptores são sensores essenciais para o sistema respiratório e mantêm a homeostase dos gases e induzem a regulação rápida da ventilação [3,5,6]. Os quimiorreceptores periféricos estão localizados nos corpos carotídeos e nos arcos aórticos e são responsáveis por monitorar a pressão parcial de O₂ (PO₂) e, em menor escala, a pressão parcial de CO₂ (PCO₂). Esses receptores estão localizados em regiões altamente vascularizadas e enviam as informações aferentes para o núcleo do trato solitário (NTS) e para outras regiões localizadas no tronco encefálico, que participam da circuitaria neural do controle da respiração [3].

Os quimiorreceptores centrais estão distribuídos pelo encéfalo, mas principalmente no tronco encefálico, em núcleos como o NTS, locus coeruleus (LC), rafe bulbar e núcleo retrotrapezoide/grupo respiratório parafacial (RTN/pFRG) [7,8]. Esses centros são intrinsecamente sensíveis ao CO₂ e H⁺ e se comunicam com o controlador central do sistema respiratório, para ajustar a resposta ventilatória de acordo com a necessidade [3,5].

Como mencionado anteriormente, o controlador central respiratório é dividido em centros de geração de padrão e de ritmo, e eles estão localizados no tronco encefálico, especificamente na ponte e no bulbo. Esses centros são formados por grupamentos neuronais distintos, que podem ser subdivididos em três grupos, com base nas fases da respiração em que cada um está ativo [9]: *i*) coluna respiratória ventral (CRV); *ii*) grupamento respiratório dorsal (GRD) e; *iii*) grupo respiratório pontino (GRP) (Figura 1.1).

A CRV está localizada bilateralmente na face ventral do bulbo e se estende, no sentido rostro-caudal, do núcleo do nervo facial até a medula espinhal. Essa região possui núcleos neuronais que podem ser separados de forma anatômica e funcional, sendo eles: *i*) grupo respiratório parafacial/parafacial lateral (pFRG/pFL), considerado um centro oscilador expiratório, que também está envolvido na geração da expiração ativa [9]; *ii*) complexo de Bötzinger (BötC), que possui neurônios inibitórios que participam da expiração; *iii*) complexo pré-Bötzinger (preBötC), que é o núcleo gerador do ritmo inspiratório [3,6,10]; *iv*) grupo ventral respiratório rostral (rVRG), de onde partem neurônios pré-motores excitatórios da inspiração e; *v*) grupo ventral respiratório caudal (cVRG), que possui neurônios pré-motores abdominais expiratórios [9,11].

O GRD está localizado dentro do NTS e recebe aferências importantes de mecano e quimiorreceptores, além de *inputs* do sistema cardiovascular [9]. Esse grupamento não está envolvido na geração do ritmo respiratório, mas possui conexões com os demais grupos que podem influenciar no padrão ventilatório.

Por fim, o GRP está localizado na região dorsolateral da ponte, inclui os núcleos Kölliker-Fuse (KF) e parabraquial (PB) e está envolvido no controle da pós-inspiração. O KF envia projeções para o núcleo ambíguos (NA), para motoneurônios da laringe, e é capaz de controlar a constrição da glote durante a saída do ar, diminuindo a velocidade da saída. Essa constrição é essencial para criar um gradiente de pressão intra-abdominal para reflexos expiratórios, como o da tosse e do espirro. Além disso, o GRP é um importante centro para a coordenação entre respiração e deglutição [9].

Figura 1.1 - Esquema de um corte sagital do tronco encefálico de um rato

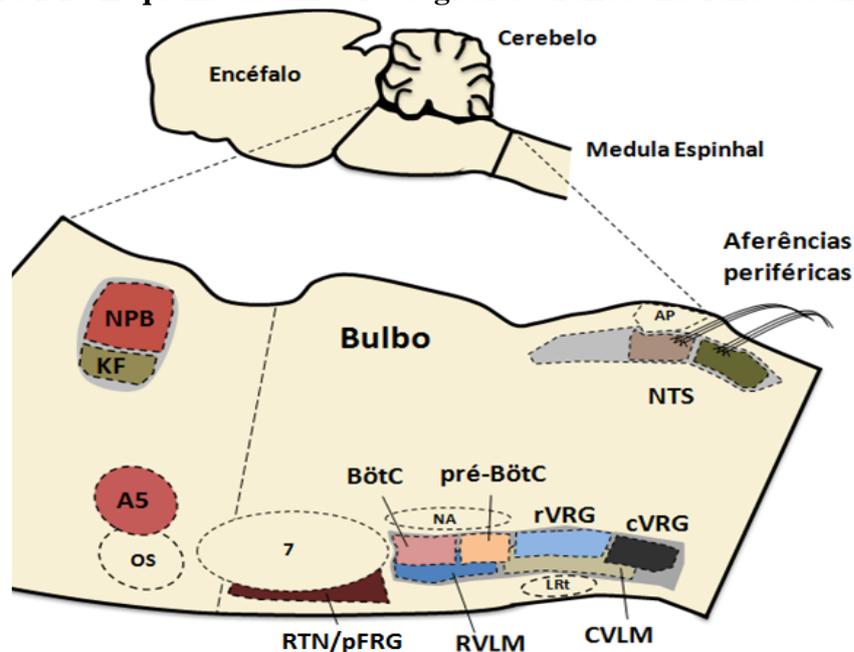


Figura 1.1: Esquema representativo de um corte sagital do tronco encefálico de um rato, com foco na ponte e no bulbo. Abreviaturas: NPB: núcleo parabraquial; KF: Kölliker-Fuse; A5: área catecolaminérgica A5 da ponte; OS: oliva superior; 7: núcleo do nervo facial; RTN/pFRG: núcleo retrotrapezoide/grupamento parafacial; NA: núcleo ambíguos; BötC: complexo Bötzing; pré-BötC: complexo pré-Bötzing; RVLM: região rostral ventrolateral do bulbo; rVRG: grupo ventral respiratório rostral; cVRG: grupo ventral respiratório caudal; CVLM: região caudal ventrolateral do bulbo; LRt: núcleo reticular lateral; NTS_r: porção rostral do núcleo do trato solitário; NTS_i: porção intermediária do núcleo do trato solitário; NTS_c: porção caudal do núcleo do trato solitário; GRD: grupamento respiratório dorsal. (Adaptado de [12,13])

O terceiro componente básico envolvido na coordenação dos eventos respiratórios são os músculos efetores, que recebem o *output* motor do controlador central. Os músculos podem ser divididos em inspiratórios (diafragma, intercostais externos e escalenos), expiratórios (abdominal e intercostais internos) e acessórios (esternocleidomastóideos). Para que ocorra a inspiração, o diafragma se contrai em direção à cavidade abdominal e, ao mesmo tempo, os intercostais externos e os escalenos se contraem. Essas contrações ativas promovem um aumento do volume da caixa torácica, aumentando o gradiente de pressão e permitindo a entrada do ar ambiente nos pulmões. Ao término da inspiração, a atividade dos motoneurônios

inspiratórios cessa e os músculos relaxam. Isso faz com que o diafragma e os demais músculos retornem à posição inicial e, conseqüentemente, ocorra a saída do ar de forma passiva. E, como dito anteriormente, no início da expiração, os músculos constritores das vias aéreas superiores se contraem, promovendo um aumento transitório da resistência da passagem do ar.

Diante disso, é possível observar que a circuitaria neural envolvida para que a primeira etapa da respiração, a ventilação, ocorra é bastante complexa. A respiração é monitorada e regulada ciclo-a-ciclo e é um processo que não pode falhar. A Figura 1.2 resume brevemente a rede respiratória, com os principais componentes que a mantêm.

Figura 1.2 - Figura esquemática da rede respiratória

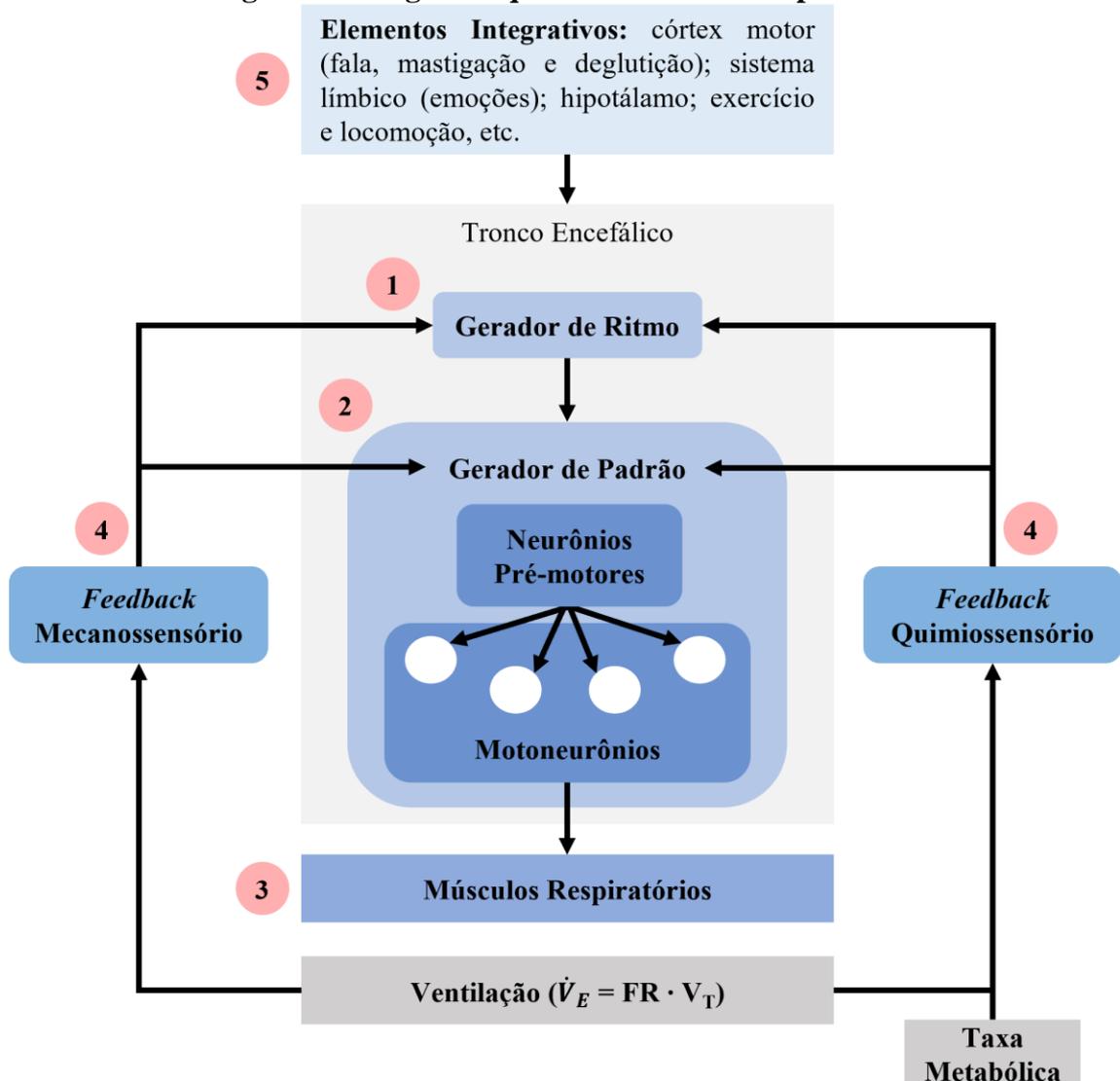


Figura 1.2: Figura esquemática da rede respiratória. Gerador de ritmo (1) está associado à frequência de eventos e o gerador de padrão (2) à forma desses eventos. Esses centros enviam projeções para motoneurônios, que inervam os músculos respiratórios (3) e efetuam as contrações musculares. Os mecano e quimiorreceptores compõem o *feedback* sensorial (4) para o centro integrador, visando ajustar a ventilação de acordo com a necessidade. Por fim, os elementos integrativos (5) participam da modulação da atividade respiratória e enviam projeções para o gerador de ritmo. (Adaptado de [9])

1.2. Epilepsia

A epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado pela ocorrência de crises convulsivas recorrentes e espontâneas [14–16]. Ela é altamente prevalente na população e representa um problema de saúde global, afetando cerca de 65 milhões de pessoas em todo o mundo [14,15,17], e estima-se que a prevalência seja ainda maior em países de baixa e média renda quando comparado aos países desenvolvidos [17–19]. Isso se deve, provavelmente, a uma maior incidência de acidentes envolvendo automóveis, problemas durante o parto e neuroinfecções nesses países de média e baixa renda [14]. Ainda que todos os indivíduos com epilepsia apresentem crises, nem todos os pacientes que apresentam crises são diagnosticados com epilepsia [20]. As crises epiléticas são anormalidades comportamentais transitórias que compreendem sinais ou sintomas objetivos, causados por atividade neuronal anormal, excessiva ou síncrona no cérebro, e podem ser agudas ou espontâneas e recorrentes [14,20]. Embora a causa da epilepsia em muitos pacientes seja desconhecida, diversas lesões que afetam a função cerebral podem levar a convulsões, como acidentes vasculares cerebrais ou lesões traumáticas no cérebro, doenças infecciosas, tumores, doenças autoimunes e até mutações genéticas [14].

A epilepsia pode ser fatal e a mortalidade está relacionada direta ou indiretamente com as crises [14,21]. Dentre as causas de morte diretamente relacionadas com a epilepsia, é possível citar a SUDEP (morte súbita em pacientes com epilepsia, do inglês: *Sudden Unexpected Death in Epilepsy*, explicada com mais detalhes posteriormente), afogamento, estado epilético, acidentes com automóveis, quedas, queimaduras e outro acidentes relacionados aos eventos ictais (de crise) [21]. Com relação às causas indiretas, é possível citar como exemplo o suicídio, pneumonia causada por aspiração e doenças cardiovasculares, que podem ser agravadas ou causadas pelo uso crônico de medicamentos anticonvulsivantes [21]. Portanto, os pacientes com epilepsia enfrentam um aumento significativo no risco de morte prematura em comparação com indivíduos sem epilepsia.

O tratamento inicial para a epilepsia consiste na monoterapia com medicamentos anticonvulsivantes para suprimir a ocorrência de crises, embora eles possam não ser eficazes contra o processo epileptogênico em si. Os primeiros medicamentos contra crises possuíam uma relação relativamente baixa entre tolerabilidade-eficácia. Porém, apesar dos avanços no desenvolvimento de novos medicamentos anticonvulsivantes, as novas drogas não aumentaram de forma significativa a porcentagem de pacientes livres de crises [14]. Dessa forma, aproximadamente um terço dos pacientes com epilepsia, em torno de 21 milhões de pessoas,

permanece sem resposta ao tratamento farmacológico e apresentam crises recorrentes e descontroladas [22].

Dentre os pacientes refratários aos medicamentos, a principal causa de morte é a SUDEP [14,23], que é definida como "morte súbita, inesperada, testemunhada ou não, não traumática e não relacionada a afogamento, em pacientes com epilepsia, com ou sem evidência de convulsão, excluindo estado epiléptico documentado, em que o exame *post-mortem* não revela uma causa toxicológica ou anatômica da morte" [14,24]. A maioria dos casos de SUDEP ocorre durante a noite, provavelmente durante o sono, visto que os pacientes são encontrados na parte da manhã, próximos ou sobre a cama e em posição pronada [23,25]. Apesar desse cenário, a grande maioria dos casos de SUDEP ocorre sem que haja alguma testemunha, o que torna difícil a compreensão dos eventos que levam à morte.

Estudos indicam que a ocorrência de crises tônico-clônicas generalizadas é um fator de risco importante para a SUDEP [24,26–31]. A fisiopatologia da SUDEP não foi precisamente determinada e provavelmente é multifatorial, embora evidências indiquem que está relacionada a uma falha respiratória induzida por convulsões (discutido com mais detalhes à frente) [24,26–34].

1.3. Efeitos de crises convulsivas na respiração

Já é conhecido que pacientes com epilepsia apresentam mudanças no padrão respiratório no repouso e durante as crises [35,36]. Um estudo amplo, que investigou 304 crises em 56 pacientes com epilepsia, revelou uma conexão entre o nível de dessaturação de oxigênio e diferentes fatores, como a duração, o tipo e a origem das crises [35]. Em 33,2% das crises, a saturação de oxigênio caiu para abaixo de 90%, em 10,2% dos casos, as crises levaram a uma saturação abaixo de 80% e, por fim, em 3,6% das crises houve uma queda na saturação abaixo 70%. Além disso, a dessaturação de oxigênio foi acompanhada por um aumento do dióxido de carbono expirado no final da expiração (ETCO₂), o que indica que o desbalanço dos gases sanguíneos ocorreu devido a uma hipoventilação ictal [35].

A hipoventilação relacionada a crises pode ser causada por uma apneia obstrutiva (bloqueio das vias aéreas) ou por uma apneia central (falha da circuitaria neural em gerar um *output* motor apropriado e rítmico) [37]. No estudo mencionado, foi observado que apneias de origem central ocorreram em 50% das crises monitoradas e apneias obstrutivas ocorreram em 9% dos casos [35].

Além da hipoventilação ictal, outro efeito que as crises convulsivas têm na respiração está relacionada com a quimiorrecepção central de pacientes com epilepsia. Sainju e colaboradores (2019) realizaram um estudo em Unidades de Monitoramento de Epilepsia (do inglês *epilepsy monitoring units*; EMUs) e mediram a resposta ventilatória ao CO₂ (resposta ventilatória à hipercapnia; HCVR) em períodos entre crises (repouso) de pacientes com epilepsia refratária [36]. Eles observaram que a HCVR foi inversamente proporcional ao ETCO₂ no período basal, o que indica uma atenuação da quimiorrecepção ao CO₂ durante o repouso. De forma semelhante, pacientes com síndrome de Dravet (encefalopatia epiléptica sem tratamento, cuja causa mais comum é uma mutação no gene *SCN1A*, que codifica o canal de sódio Nav1.1 [38,39]) apresentam uma HCVR atenuada [33]. Pacientes com essa síndrome são muito susceptíveis a SUDEP, afetando entre 5% a 10% dos casos [33,39].

Outro estudo, realizado por Hampson e colaboradores (2022), utilizou ressonância magnética funcional para caracterizar funcionalmente segmentos do tronco encefálico durante um estímulo hipercápnico. O trabalho demonstrou que pacientes com epilepsia apresentam uma atividade cerebral do tronco encefálico aumentada (principalmente da rafe dorsal) frente ao aumento de CO₂ inalado, quando comparado com pacientes saudáveis [40]. Isso indica que os pacientes com epilepsia apresentam um esforço generalizado maior para ajustar a ventilação do que pacientes saudáveis, frente ao mesmo estímulo de CO₂. Também foram encontradas alterações funcionais na conectividade do tronco encefálico, em regiões relacionadas com o controle da respiração, como já foi demonstrado anteriormente em casos de SUDEP [41].

Diante de tantos fatores que podem estar por trás dos casos de SUDEP, um importante e grande estudo realizado em EMUs do mundo inteiro realizou uma análise sistemática de dados cardiorrespiratórios e observou um padrão na ordem de eventos que ocorrem nos casos de SUDEP [31]. Apesar de ser um evento raro de ocorrer dentro de EMUs, 16 casos de SUDEP foram analisados, sendo que 14 ocorreram de noite. Foi visto que após eventos de crises tônico-clônicas generalizadas, ocorre uma disfunção respiratória, com eventos de apneias transientes, que evoluem para uma apneia terminal, seguida da assistolia terminal (Figura 1.3). Esse estudo reforçou a importância da falha respiratória nos casos fatais.

Figura 1.3 - Ordem de eventos na SUDEP

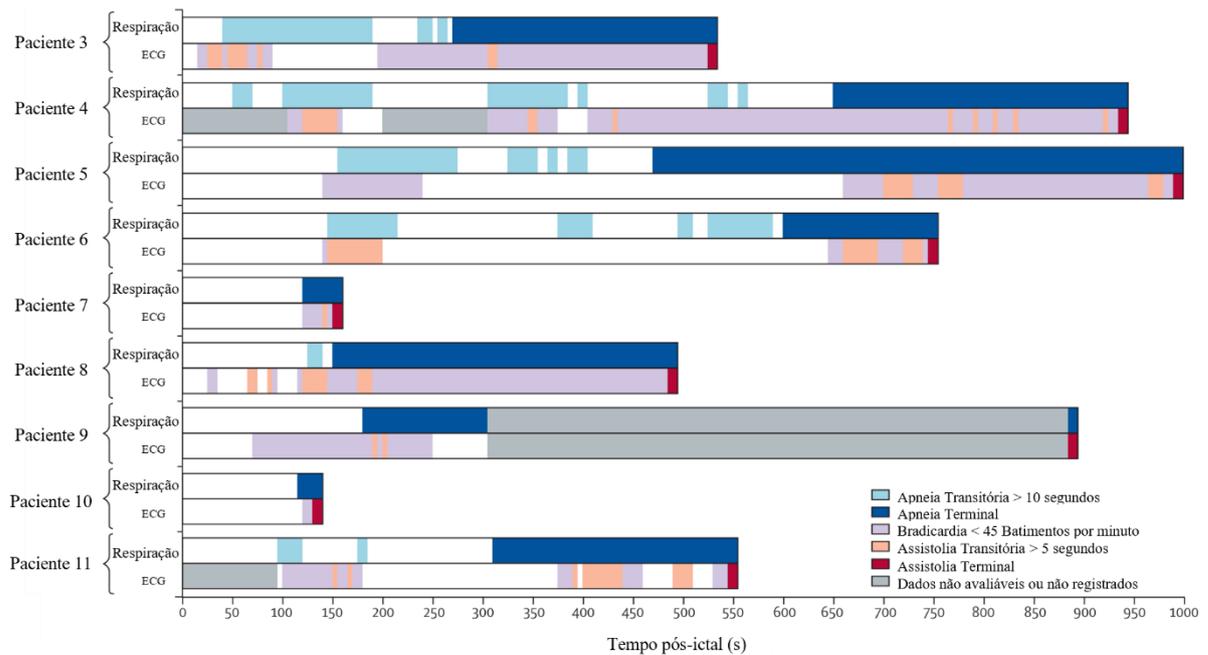


Figura 1.3: Padrão da sucessão de eventos após o término da crise em nove pacientes que morreram de SUDEP. Para cada paciente há dados respiratórios e cardíacos. É possível observar que o evento da apneia terminal precede a assistolia terminal, indicando o importante papel da falha respiratória no evento fatal (Adaptado de [31]).

1.4. Modelos animais para o estudo de crises

Considerando os diversos efeitos que crises convulsivas apresentam, modelos animais têm sido utilizados para compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos do controle respiratório durante crises na epilepsia [42,43]. O modelo animal da síndrome de Dravet, um camundongo *knock-in* do gene *SCN1A*, apresenta crises espontâneas, uma HCVR atenuada, apneias e uma hipoventilação no período basal [44]. Em outro modelo, em camundongos DBA/1 suscetíveis a convulsões audiogênicas, foi observada uma parada respiratória fatal após eventos de crises generalizadas [45]. Além disso, a ocorrência da parada respiratória induzida por crises diminuiu de forma significativa após lesões eletrolíticas no complexo amigdalóide, o que indica que a amígdala é uma região que possui conexões para o tronco encefálico e que ela é crucial para a ocorrência da parada respiratória [46]. Outro modelo animal de crises audiogênicas, o *Wistar Audiogenic Rat* (WAR), apresenta atenuação da ventilação após exposição à hipercapnia e à hipóxia [47], indicando uma quimiorrecepção reduzida.

Dessa maneira, é possível observar que modelos animais são capazes de reproduzir fenótipos importantes observados em pacientes com epilepsia, como atenuação da resposta ao CO₂, ventilação irregular no período basal e paradas respiratórias associadas a eventos ictais. Dentre os principais modelos experimentais, as crises induzidas por pentilenotetrazol (PTZ)

têm sido extensiva e confiavelmente utilizadas para testes de medicamentos anticonvulsivantes [42,43,48–50]. O PTZ estimula a atividade epileptogênica ao bloquear os receptores de GABA_A e, conseqüentemente, ao prejudicar a transmissão inibitória mediada por GABA [51,52], e é utilizado como um modelo de crise tanto de forma aguda quanto crônica [53]. Quando injetado agudamente, o PTZ induz crises de escores (severidades) variados e é uma ferramenta relevante para o estudo dos efeitos agudos de crises em diversos parâmetros fisiológicos, e para o teste dos medicamentos anticonvulsivantes. Por outro lado, quando utilizado de forma crônica, em doses subconvulsivantes (que não induzem crises comportamentais no início, mas que ao longo do tratamento a severidade das crises aumenta), o PTZ fornece informações sobre os efeitos de crises recorrentes nos sistemas fisiológicos [51–54].

Evidências prévias obtidas em estudos com camundongos, abrangendo tanto aqueles com mutação genética no gene *SCN8A* (mutação encontrada em muitos pacientes vítimas de SUDEP) quanto aqueles injetados, de forma aguda, com PTZ, indicaram a ocorrência de morte induzida por crises, correlacionada com episódios de apneia durante uma crise tônica. Essa condição respiratória comprometida assemelha-se notavelmente à descrita em um relato de caso envolvendo um paciente do sexo masculino, de 18 meses de idade, portador de uma mutação no gene *SCN8A* [55].

Embora essas evidências sugiram que a morte induzida por convulsões com PTZ envolva parada respiratória em camundongos, até onde sabemos, não há relato na literatura que avalie sistematicamente crises induzidas por PTZ em ratos e, portanto, seu potencial como modelo para estudar a atividade respiratória durante eventos ictais. Assim, no presente estudo, administramos agudamente diferentes doses de PTZ para induzir quimicamente crises em ratos adultos e testamos a hipótese de que a magnitude da atividade respiratória disfuncional varia de acordo com a severidade da crise. Também avaliamos se a parada respiratória é desencadeada concomitantemente com eventos de convulsão tônica.

Além disso, no presente trabalho também avaliamos o efeito de crises convulsivas repetidas, induzidas de forma crônica com PTZ, na quimiorrecepção de ratos adultos. Nessa etapa, testamos a hipótese de que a recorrência de crises convulsivas atenua a quimiorrecepção ao CO₂. Também testamos se é necessário que haja uma maior prevalência de crises severas para que ocorra a atenuação da quimiorrecepção.

2. Justificativa

Diante dessas informações, o presente trabalho busca elucidar alguns acontecimentos respiratórios que ocorrem durante crises convulsivas, com um foco maior para os eventos fatais e similares aos casos de SUDEP. Esse estudo foi desenvolvido em duas etapas, de forma não concomitante, e a pergunta da segunda etapa surgiu após a conclusão da primeira. Apesar de não utilizarmos um modelo animal de epilepsia *per se*, as crises agudas e crônicas induzidas por PTZ fornecem informações relevantes para o estudo da epilepsia. Por se tratar de uma doença neurológica tão prevalente e com tantas consequências nas vidas dos pacientes que a tem, buscar compreender alguns mecanismos que afetam a circuitaria neural respiratória é de grande valia.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral – *Crises Agudas*

Avaliar a atividade respiratória antes, durante e após crises convulsivas agudas induzidas por PTZ de ratos *Wistar* adultos.

3.1.1. Objetivo específico 1

Avaliar o perfil da atividade respiratória em cada nível de severidade de crise convulsiva aguda induzida por PTZ.

3.1.2. Objetivo específico 2

Avaliar se a severidade da crise convulsiva induzida por PTZ está diretamente relacionada com um maior comprometimento da atividade respiratória.

3.2. Objetivo geral – *Crises Repetidas*

Avaliar a resposta quimiossível ao CO₂ após crises convulsivas repetidas induzidas cronicamente por PTZ de ratos *Wistar* adultos.

3.2.1. Objetivo específico 1

Avaliar a resposta respiratória à hipercapnia 7% CO₂ após crises repetidas induzidas por PTZ.

3.2.2. Objetivo específico 2

Avaliar se a ocorrência de crises repetidas de escore alto é necessária para afetar a quimiossensibilidade.

4. Materiais e Métodos – *Crises Agudas*

4.1. Animais experimentais e Aprovação do Comitê de Ética

Foram utilizados ratos *Wistar* adultos (n=25), com massa corporal entre 220 e 240 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO/ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica (DFIB), a uma temperatura ambiente de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com as luzes acesas às 7 horas e apagadas às 19 horas. Os animais foram alojados em caixas coletivas de polipropileno (35 x 50 x 17 cm), com água e comida *ad libitum*, com um máximo de 5 animais por caixa. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram acondicionados em caixas individuais (20 x 30 x 20 cm). Todos os procedimentos foram realizados durante o período claro (entre 8 horas e 16 horas).

A manipulação dos animais e todos os protocolos experimentais foram conduzidos seguindo as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, com protocolo de nº 279/2022.

4.2. Cirurgia para implante dos eletrodos

Para o registro de eletroencefalografia (EEG) cortical e de eletromiografia (EMG), eletrodos foram cirurgicamente implantados [56–58]. Os parafusos dos eletrodos para o EEG foram comercialmente adquiridos (Modelo: E363-20, Plastics One Inc, Roanoke, VA, EUA) (Figura 4.1 A), e os eletrodos de EMG foram construídos a partir de um fio de aço inoxidável (comprimento de 15 cm), com revestimento de teflon, composto por 7 microfilamentos entrelaçados (Modelo: 793500, A-M Systems, Sequim, WA, EUA). Uma das extremidades do fio foi soldada a um contato de ouro comercialmente adquirido (Modelo: E363-0, Plastics One Inc, Roanoke, VA, EUA), e a outra foi soldada a uma mola adaptada (Figura 4.1 B).

Os animais foram anestesiados com isoflurano por meio de uma bomba de infusão de precisão (Bonther, Ribeirão Preto, SP, Brasil) em concentrações de 5% para indução e 1,5% a 2,5% para manutenção. Após a verificação do plano anestésico, feita através do teste do reflexo interdigital das patas traseiras, os animais passaram por dois procedimentos cirúrgicos em sequência: *i*) inserção dos eletrodos de EMG no músculo diafragma e *ii*) estereotaxia para implantar os eletrodos de EEG.

4.2.1. Implante de eletrodos de EMG

Para implantar o eletrodo de EMG no diafragma (DIA_{EMG}), foi feita uma tricotomia do topo da cabeça e da região abdominal (abaixo da última costela do lado direito do animal). As regiões foram esterilizadas com clorexidina 2%, uma injeção subcutânea (s.c.) de anestésico local foi aplicada (0,1 mL de cloridrato de lidocaína 2%, adrenalina 1:200000) e duas incisões na pele foram feitas: uma no topo da cabeça e outra abaixo da última costela, na diagonal. Um par de eletrodos de EMG foi tunelado de forma s.c., utilizando um trocarte, através da incisão da cabeça até a incisão sob a costela. Em seguida, pequenas incisões foram feitas nos músculos do abdômen, o que permitiu acesso à cavidade abdominal, e os eletrodos foram implantados no músculo diafragma. Os cortes foram suturados e esterilizados novamente com clorexidina 2%.

4.2.2. Implante de eletrodos de EEG

Para implantar os eletrodos de EEG, imediatamente após a cirurgia de DIA_{EMG} , os animais foram posicionados em um aparelho esterotáxico (Kopf, Tujunga, CA, EUA). O bregma e o lambda foram alinhados no plano dorso-ventral (DV) e três eletrodos de EEG foram implantados na calota craniana:

- i)* eletrodo de sinal: 2 mm anterior ao bregma e 2 mm lateral à linha média (lado direito);
- ii)* eletrodo de referência: 4 mm anterior ao lambda e 2 mm lateral à linha média (lado direito);
- iii)* eletrodo de aterramento: entre os eletrodos de sinal e de referência, 2 mm lateral à linha média (lado esquerdo).

Por fim, os eletrodos de EEG e EMG foram posicionados em um soquete de 6 canais (Modelo: MS363, Plastics One Inc, Roanoke, VA, EUA), que foi fixado ao crânio comacrílico dental.

Após a cirurgia, os animais receberam analgésicos (flunixin meglumine 2,5 mg/kg, s.c.) e antibióticos (Pentabiótico, Fontoura-Wyeth, SP, Brasil, 80.000 UI; intramuscular, i.m.), entrando em um período de recuperação de 5 a 7 dias.

Figura 4.1 - Eletrodos de EEG e EMG

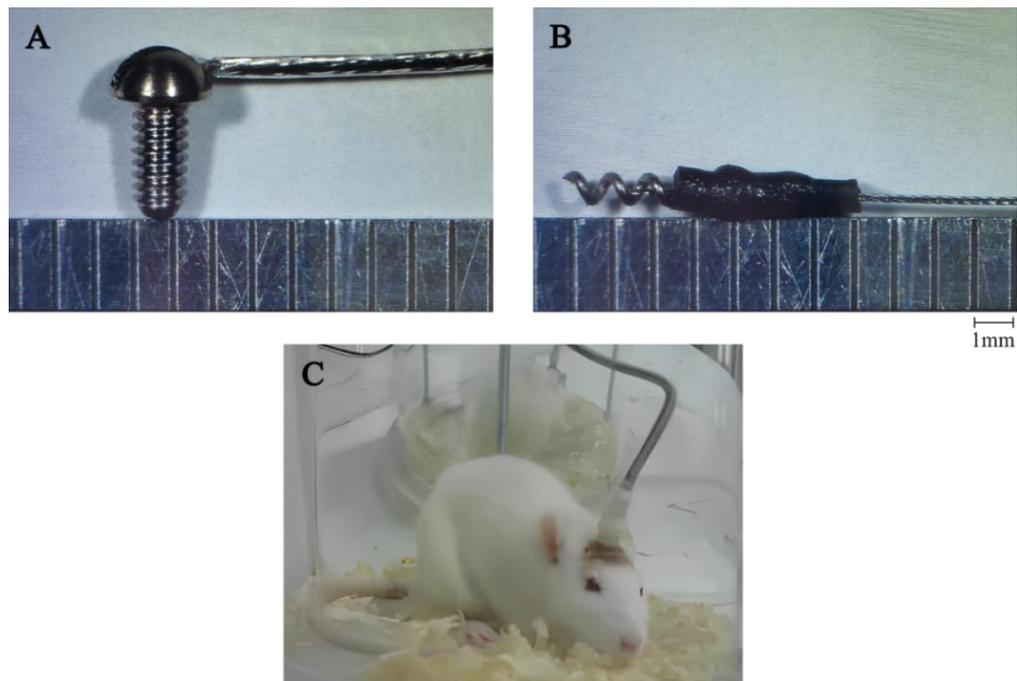


Figura 4.1: (A) Eletrodo de EEG (Modelo: E363-20, Plastics One Inc, Roanoke, VA, EUA). (B) Extremidade do eletrodo de EMG soldada à mola adaptada. (C) Animal conectado ao sistema de aquisição de sinais.

4.3. Registro de EEG e EMG

Um cabo isolado foi conectado ao soquete na cabeça do animal e, em seguida, conectado a um *swivel* elétrico na superfície interna da tampa de uma câmara acrílica cilíndrica de pletismografia (5L; 18,5 cm de diâmetro e 18 cm de altura; Bonther, Ribeirão Preto, SP, Brasil), que permitiu ao animal mover-se livremente (Figura 4.1 C). Os sinais foram amplificados em x1000 (Modelo: 1700, A-M Systems, Sequim, WA, EUA) e um filtro de bandas (corte inferior e superior: 0.1 e 500 Hz para o EEG e 0.1 e 1 kHz para o EMG) foi passado. A aquisição de sinal foi amostrada a 2 kHz pelo sistema PowerLab (ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália) com o software LabChart7.

4.4. Droga

Para induzir as crises agudas com uma ampla variedade de severidades, foi utilizado o pentilenetetrazol (PTZ; Sigma-Aldrich). O PTZ foi injetado em quatro doses diferentes (30, 60, 75 e 90 mg/kg) [54]. Cada dose foi utilizada em um grupo experimental, o que permitiu explorar melhor a relação entre a severidade das crises e a atividade respiratória.

4.5. Protocolo experimental

Imediatamente antes dos experimentos, a droga foi dissolvida à fresco em solução salina estéril a 0.9%. O protocolo experimental foi realizado de cinco a sete dias após a cirurgia, da seguinte forma: os animais foram colocados na câmara de pletismografia, conectados ao sistema de aquisição de sinais, e permitidos se aclimatar por pelo menos 30 minutos antes de iniciar o experimento. Durante todo o procedimento, a câmara foi ventilada com ar ambiente ($2000 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Após o período de aclimação, foi feito um registro basal dos sinais de EEG e EMG de 30 minutos. Por fim, o PTZ foi injetado intraperitonealmente (i.p.) em um volume de 1 mL/kg e, em seguida, um registro de uma hora foi realizado. Durante todo o protocolo, para identificar corretamente o comportamento em cada evento de crise, cada etapa do experimento foi registrada em vídeo (Logitech, c270 HD 720p 30fps) pelo sistema de aquisição e sincronizada com o EEG/EMG. Em quatro animais, após o período de aclimação e antes da injeção de PTZ, foi injetada salina estéril 0,9%, em um volume de 1 mL/kg . Essa etapa serviu como um controle das variáveis respiratórias para o estresse da injeção (Figura 4.2).

Após o término dos experimentos, os animais foram eutanasiados com uma overdose de anestésico inalatório (isoflurano).

Figura 4.2 - Protocolo experimental

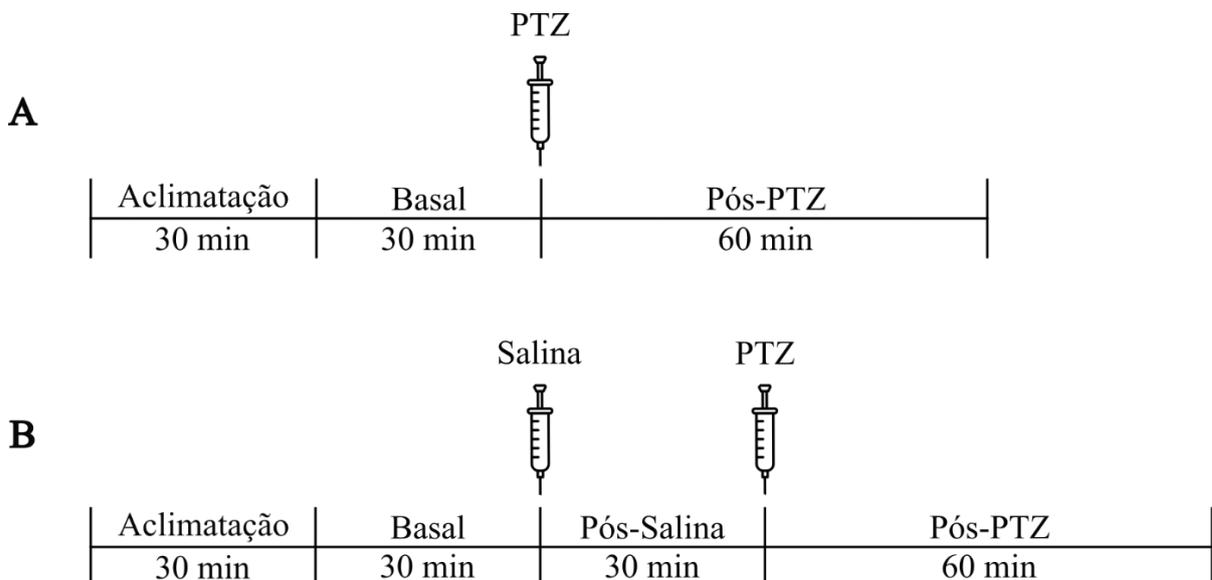


Figura 4.2: (A) Protocolo experimental, que envolveu um período de 30 minutos de aclimação na câmara de pletismografia, seguidos de 30 minutos de registro basal, injeção do PTZ e, por fim, 1 hora de registro após injeção de PTZ. (B) Protocolo experimental para os animais que receberam a injeção de salina antes da injeção de PTZ.

4.6. Análise dos dados e Estatística

As crises induzidas por PTZ são bem descritas e já foram classificadas na literatura [59–62]. Em todos os experimentos, a análise do EEG foi realizada simultaneamente com a análise de vídeo, e a severidade das crises comportamentais foi classificada de acordo com trabalhos anteriores [59,60,63,64]. As crises induzidas por PTZ foram pontuadas usando uma escala de crise modificada [59,60], que varia entre zero e cinco, da seguinte forma: 0) sem alterações no comportamento; 0.5) comportamento anormal ou parada abrupta no comportamento, com uma crise do tipo ausência; 1) espasmos mioclônicos únicos (referidos como *jerks* mioclônicos); 2) clonia unilateral ou incompleta; 3) clonia bilateral total dos membros anteriores; 3.5) clonia dos membros anteriores com um componente tônico e torção do corpo; 4) clonia de todos os membros; 5) crise tônico-clônica totalmente desenvolvida (Tabela 4.1).

A pontuação 0.5 foi associada a uma parada comportamental durante o estado de vigília e foi classificada como uma crise do tipo ausência, caracterizada por eventos de *spike wave discharge* (SWD) no EEG [65,66]. Para esta análise, o EEG que foi associado à interrupção comportamental durante o estado de vigília foi inspecionado visualmente *offline*, e apenas eventos que duraram mais de 2 segundos foram analisados, devido à necessidade de correlação com a interrupção comportamental. Duas variáveis foram avaliadas a partir da análise comportamental de acordo com as doses de PTZ utilizadas: a crise mais severa (maior escore de crise) e a latência (em segundos) até a primeira crise comportamental (o primeiro *jerk* mioclônico).

Tabela 4.1 - Escores das crises convulsivas

Score	Expressão comportamental
0	Sem mudança comportamental
0.5	Crise do tipo ausência
1	Espasmos (<i>jerks</i>) mioclônicos
2	Clonia unilateral
3	Clonia de membros anteriores
3.5	Clonia de membros anteriores com componente tônico
4	Clonia de todos os membros
5	Tônico-clônico

Tabela 4.1: Tabela dos escores das crises convulsivas generalizadas. (Adaptado de [63,64])

A atividade respiratória foi avaliada diretamente a partir do DIA_{EMG} , que teve o sinal bruto integrado. Utilizou-se a função de integral do software LabChart7, com apenas valores positivos e uma constante de tempo de 50 ms. A frequência respiratória (FR) e a amplitude máxima do DIA_{EMG} (Peak Amp) foram quantificadas a partir dessa integração. A FR foi quantificada em ciclos/min e o DIA_{EMG} foi representado em unidades arbitrárias. Além disso, os valores dessas variáveis foram apresentados aqui como valores normalizados (normalizados ao período após a injeção de PTZ, mas antes de qualquer atividade ictal). Os mesmos critérios de análise foram aplicados a todos os animais (Figura 4.3):

- i) O período basal (antes da injeção de PTZ) foi considerado durante períodos de vigília tranquila;
- ii) Para os animais que receberam a salina, o período pós-injeção foi considerado como 30 segundos após a injeção. O período de recuperação foi analisado 30 minutos após a injeção;
- iii) O período após a injeção de PTZ (antes do início de qualquer crise) foi considerado como 30 segundos após a injeção de PTZ. Como o PTZ em si aumentou o comportamento exploratório e a atividade respiratória, esse período foi usado para normalizar as análises relacionadas aos momentos ictais;
- iv) Eventos pré-ictais (antes da crise) foram analisados imediatamente antes do início do evento de crise (quando possível);
- v) Eventos ictais foram analisados de acordo com cada tipo de crise (ver abaixo);
- vi) Eventos pós-ictais foram analisados imediatamente após o fim do evento de crise (quando possível).

Figura 4.3 - Desenho esquemático dos períodos analisados

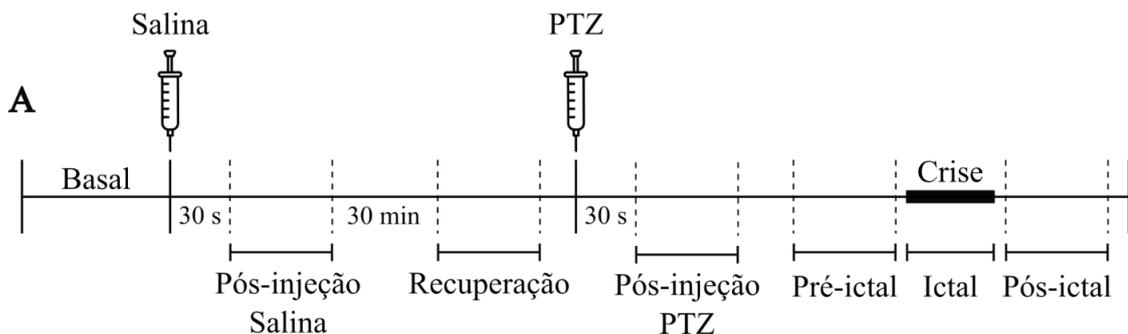


Figura 4.3: (A) Desenho esquemático dos períodos que foram considerados para a análise do DIA_{EMG} . O período basal foi analisado em períodos de vigília tranquila. Para os animais que receberam a injeção de salina, a análise foi feita 30 segundos e 30 minutos após a injeção. Esses momentos foram nomeados como “pós-injeção salina” e “recuperação”, respectivamente. A análise pós-injeção de PTZ foi feita 30 segundos após. As análises pré e pós ictais foram realizadas imediatamente e antes e após a crise (quando possível), respectivamente. Obs.: desenho esquemático fora de escala.

A análise da atividade respiratória (DIA_{EMG} : FR e Peak Amp) foi realizada de acordo com o tipo de crise (crise do tipo ausência, *jerks* mioelétricos, clônias e crise tônico-clônica), independente da dose de PTZ injetada. As crises do tipo ausência foram analisadas em três períodos: o pré-ictal, ictal e o pós-ictal.

Com relação aos *jerks* mioelétricos, dois momentos foram analisados: imediatamente antes e imediatamente depois do evento (pré- e pós-ictal). Para esse tipo de comportamento, a análise foi realizada excluindo o período ictal devido à natureza súbita desse tipo de crise, com movimentos corporais abruptos e grandes artefatos de movimento, o que dificultaram a análise precisa do EMG. Além disso, em várias ocasiões, eventos de *jerks* mioelétricos foram imediatamente seguidos por outras crises, o que prejudicou a análise do período pós-ictal de alguns eventos.

Crises clônicas frequentemente ocorriam após um período de *jerks* mioelétricos rápidos e consecutivos. Por esse motivo, a atividade respiratória foi analisada apenas durante os períodos ictal e pós-ictal.

Com relação a eventos tônico-clônicos, duas contrações tônicas do diafragma foram sempre observadas, e apenas a que apresentava o maior Peak Amp foi analisada. Devido à contração tônica (apneia da fase tônica), a FR desse tipo de crise não pôde ser avaliada. Durante crises tanto clônicas quanto tônico-clônicas, vários eventos de apneia foram identificados, e sua duração foi quantificada. Apneias foram definidas como uma parada respiratória com duração de mais de dois ciclos respiratórios.

Os dados foram representados de maneira gráfica, evidenciando cada animal. No grupo, os dados foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). Para a avaliação dos efeitos de diferentes doses na latência para a primeira crise (expressa em segundos), utilizou-se a ANOVA de uma via. Além disso, a análise foi complementada com o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de comparações múltiplas de Dunn, aplicado à pontuação da crise mais elevada. Além disso, para cada tipo de crise, as variáveis respiratórias (FR e DIA_{EMG} Peak Amp) foram comparadas durante as crises (ou seja, pré-ictal, ictal e pós-ictal) usando ANOVA de uma via. O teste de comparação múltipla post hoc de Tukey foi utilizado. A comparação da duração da apneia entre eventos de crise clônica e tônico-clônica foi avaliada usando o teste t de Student. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

5. Resultados – *Crises Agudas*

5.1. Efeitos das injeções de salina e de PTZ na atividade respiratória

A Figura 5.1 mostra os efeitos das injeções de salina e de PTZ na atividade respiratória de um mesmo animal. Após a injeção de salina (30 segundos), o DIA_{EMG} Peak Amp não foi significativamente afetado, mas apresentou um leve aumento de 1.02 ± 0.13 comparado com o período basal e, 10 minutos após a injeção, o DIA_{EMG} Peak Amp apresentou uma pequena queda (0.91 ± 0.05), comparado com o basal, que também não foi relevante (Figura 5.1 C). Quanto a FR, 30 segundos após a injeção de salina houve um aumento significativo (2.84 ± 0.37 ; $p < 0.0001$), mas após 10 minutos a FR retornou aos valores basais (1.05 ± 0.02) (Figura 5.1 D). Esse dado mostra o efeito do estresse da injeção i.p. na atividade respiratória. Além disso, é possível observar que a injeção de salina não afeta a FR nem o DIA_{EMG} Peak Amp de forma prolongada.

Com relação à injeção de PTZ, o DIA_{EMG} Peak Amp apresentou uma pequena queda não significativa (0.92 ± 0.03), comparada com o período basal (Figura 5.1 C). 30 segundos após a injeção, a FR aumentou significativamente (4.13 ± 0.24 ; $p < 0.0001$), comparada com o período basal (Figura 5.1 D). Além disso, é possível observar que o aumento da FR evocado pela injeção de PTZ foi maior do que o da injeção de salina. Não foi possível realizar a análise do período de recuperação após a injeção de PTZ, visto que, uma vez que a droga foi administrada, as crises convulsivas iniciaram.

Figura 5.1 - Efeito das injeções de salina e de PTZ

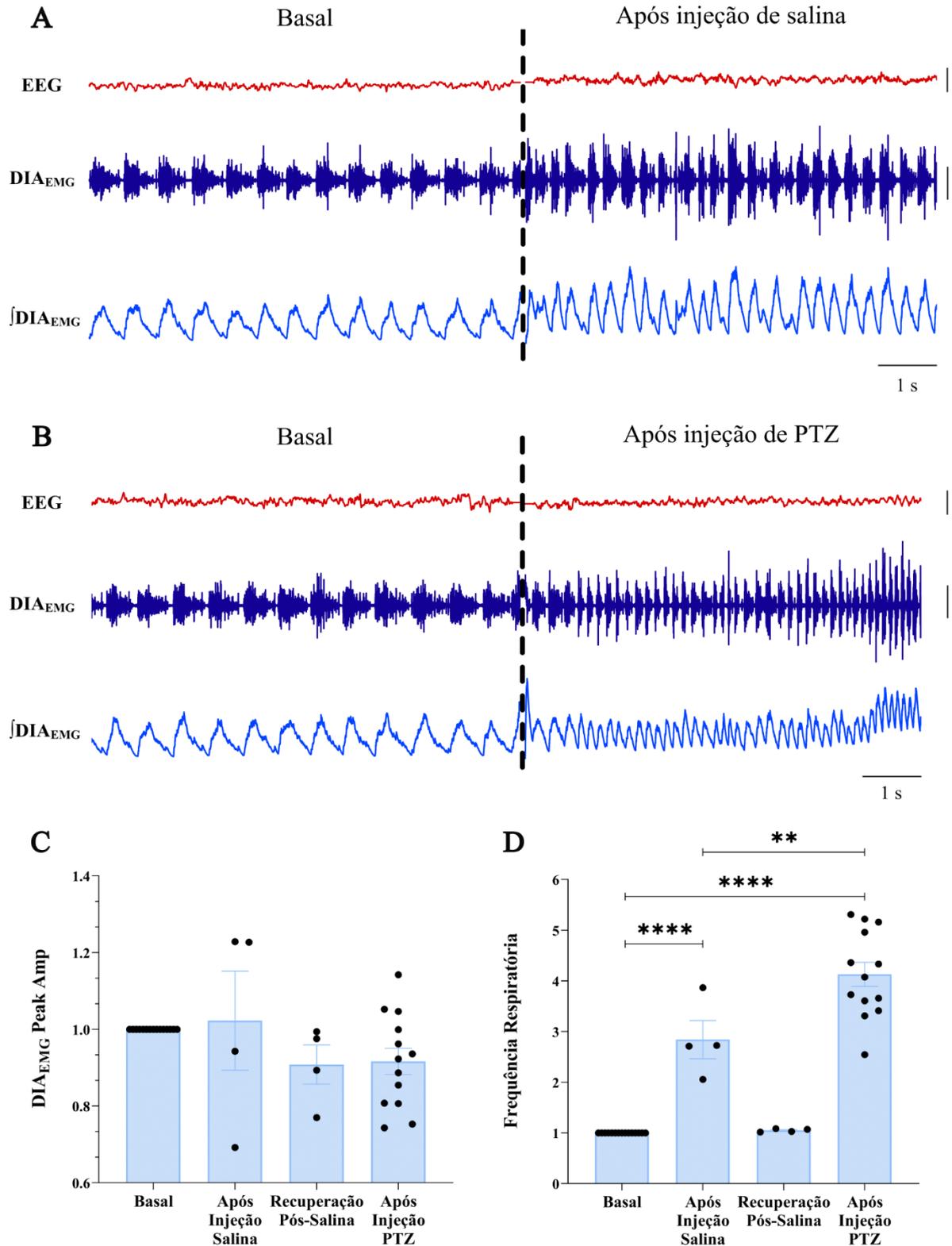


Figura 5.1: (A) Traçado representativo de um animal dos registros de EEG, DIA_{EMG} e ∫DIA_{EMG} (de cima para baixo, respectivamente) nos momentos basal (esquerda) e após injeção de salina (direita). (B) Traçado representativo, nos momentos basal e após a injeção de PTZ. Barras de escala do EEG e do DIA_{EMG}: 0.5 mV e 0.2 mV, respectivamente. (C) Dados do grupo da mudança relativa do DIA_{EMG} Peak Amp nos períodos basal, 30 segundos após a injeção de salina, 10 minutos após (recuperação pós-salina) e 30 segundos após a injeção de PTZ. (D) Dados do grupo da mudança relativa da frequência respiratória nos mesmos momentos. Cada ponto representa um animal e os dados foram expressos como média ± EPM. (****p<0.0001; **p<0.005)

5.3. Crises do Tipo Ausência diminuem a atividade respiratória

A Figura 5.3 mostra uma representação visual de registros de EEG e DIA_{EMG} de dois animais representativos, retratando uma atenuação transitória leve (Figura 5.3 A) e pronunciada (Figura 5.3 B) na atividade respiratória durante eventos do tipo ausência. Os dados do grupo mostram que durante o evento de crise (ictal), o DIA_{EMG} Peak Amp apresentou uma diminuição significativa (0.8769 ± 0.03 ; $p < 0.05$), mas a recuperação ocorreu logo após o fim da crise (Figura 5.3 C). Durante o período ictal, da mesma forma que a amplitude, a FR apresentou uma clara diminuição em comparação com o período após a injeção (e antes da crise) (0.4791 ± 0.06 ; $p < 0.0001$). Imediatamente após o término da crise (pós-ictal), a FR retornou a valores semelhantes aos observados após a injeção de PTZ e aos observados imediatamente antes do início do evento (Figura 5.3 C). Esses dados de grupo indicam que as crises do tipo ausência induzidas por PTZ são acompanhadas por uma atenuação significativa na atividade respiratória.

Figura 5.3 - Crises do Tipo Ausência diminuem a atividade respiratória

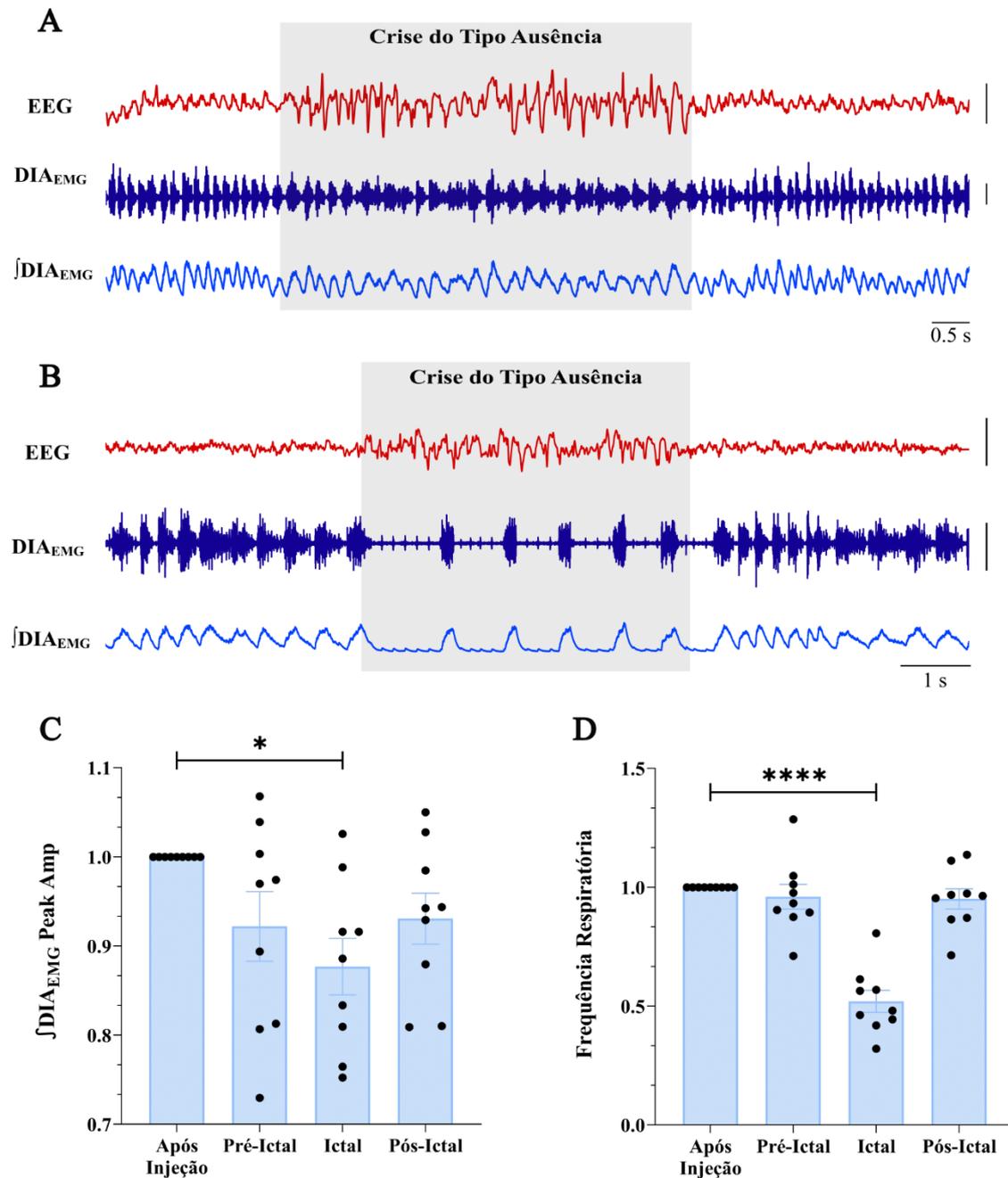


Figura 5.3: (A) Traçado representativo de um animal dos registros de EEG, DIA_{EMG} e ∫DIA_{EMG} (de cima para baixo, respectivamente). O retângulo cinza ressalta o evento de crise do tipo ausência, com uma atenuação leve da atividade respiratória. Barras de escala do EEG e do DIA_{EMG}: 0.4 mV e 0.5 mV, respectivamente. (B) Traçado representativo de um animal com uma atenuação pronunciada da atividade respiratória. Barras de escala do EEG e do DIA_{EMG}: 0.5 mV e 0.2 mV, respectivamente. (C) Dados do grupo da mudança relativa do DIA_{EMG} Peak Amp 30 segundos após a injeção de PTZ, imediatamente antes da crise (pré-ictal), durante (ictal) e imediatamente após (pós-ictal). (D) Dados do grupo da mudança relativa da freqüência respiratória nos mesmos momentos. É possível observar uma queda significativa da FR durante a crise. Cada ponto representa um animal e os dados foram representados como média ± EPM. (*p<0.05; ****p<0.0001)

5.4. *Jerks* mioclônicos e a atividade respiratória

A atividade respiratória analisada durante eventos de *jerks* mioclônicos é detalhada na Figura 5.4. Conforme mostrado, a fase pré-ictal exibiu um leve aumento no DIA_{EMG} Peak Amp (1.179 ± 0.06 ; $p < 0.05$) e um aumento na FR (1.224 ± 0.13 ; $p < 0.5$). No entanto, essas mudanças não foram estatisticamente significativas quando comparadas ao período imediatamente após a injeção de PTZ. Após o evento de *jerks* mioclônicos, houve uma mudança notável no DIA_{EMG} Peak Amp, com um aumento significativo (1.471 ± 0.19 ; $p = 0.0005$), e a FR diminuiu significativamente (0.5375 ± 0.11 ; $p < 0.0001$) (Figura 5.4 B e C).

Figura 5.4 - Jerks mioclônicos e a atividade respiratória

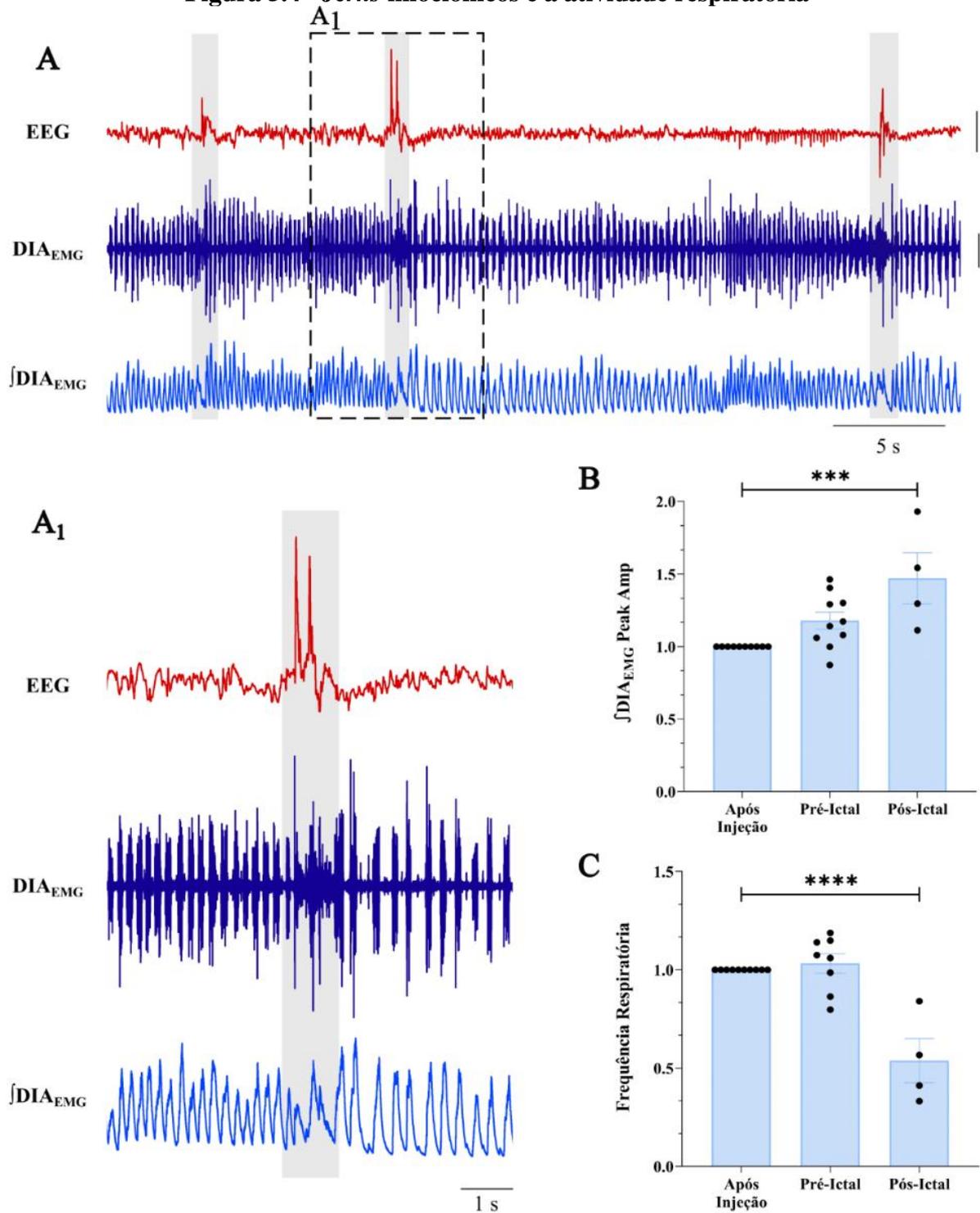


Figura 5.4: (A) Traçado representativo de um animal dos registros de EEG, DIA_{EMG} e ∫DIA_{EMG} (de cima para baixo, respectivamente). Os retângulos cinzas ressaltam eventos diferentes de jerks mioclônicos. Barras de escala do EEG e DIA_{EMG}: 0.5 mV e 0.2 mV, respectivamente. (A₁) Traçado expandido de um evento de jerk. (B) e (C) mostram os dados do grupo para a mudança relativa do DIA_{EMG} Peak Amp e FR, respectivamente, dos momentos 30 segundos após a injeção de PTZ, pré e pós-ictais. Cada ponto representa um animal e os dados foram expressos como média ± EPM. (***)p=0.0005; ****)p<0.0001)

5.5. Crises clônicas aumentam o DIA_{EMG} Peak Amp e diminuem a FR

A figura Figura 5.5 ilustra a atividade respiratória durante eventos de crise clônica. Na Figura 5.5 A, um registro de EEG e EMG de um animal representativo mostra *jerks* mioclônicos seguidos de um evento de crise clônica. É possível observar que há um período de apneia (referido como apneia ictal), seguido por uma recuperação da atividade respiratória durante o evento clônico. O DIA_{EMG} Peak Amp aumentou significativamente tanto durante (1.755 ± 0.11 ; $p=0.0005$) quanto após (1.712 ± 0.16 ; $p=0.0005$) o evento clônico em comparação com o período após a injeção de PTZ (Figura 5.5 B). Após a apneia ictal, há uma diminuição marcante na FR tanto durante o período ictal quanto na fase pós-ictal (0.6418 ± 0.04 e 0.5843 ± 0.05 , respectivamente; $p<0.0001$) (Figura 5.5 C).

Figura 5.5 - Crises clônicas aumentam o DIA_{EMG} Peak Amp e diminuem a FR

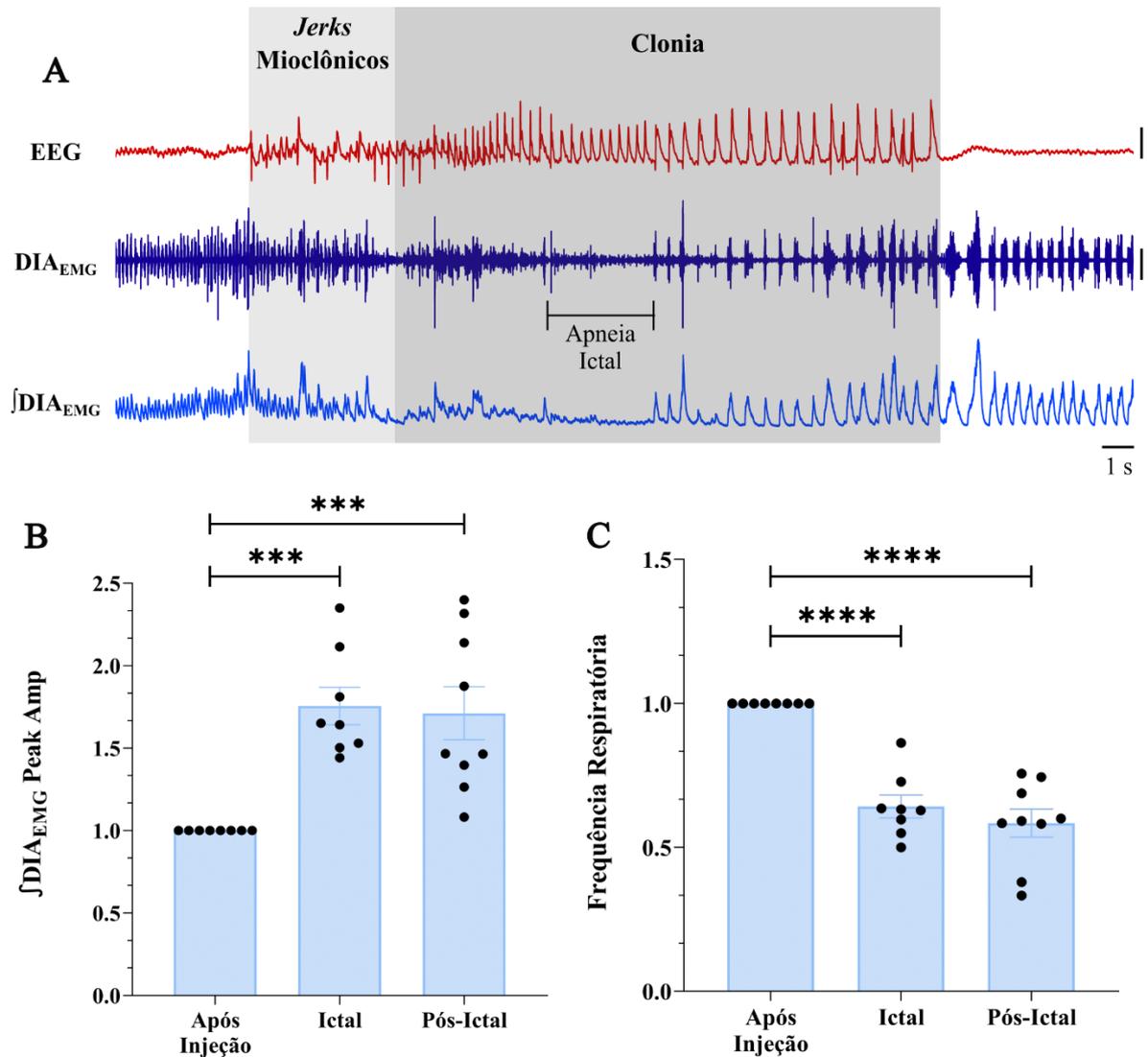


Figura 5.5: (A) Traçado representativo de um animal dos registros de EEG, DIA_{EMG} e ∫DIA_{EMG} (de cima para baixo, respectivamente). Os retângulos cinza claro e cinza escuro abrangem *jerks* mioclônicos consecutivos e o evento de crise clônica, respectivamente. É possível observar a apneia ictal durante o evento. (B) e (C) mostram os dados do grupo para a mudança relativa do DIA_{EMG} Peak Amp e FR, respectivamente, dos momentos 30 segundos após a injeção de PTZ, ictal e pós-ictais. Cada ponto representa um animal e os dados foram expressos como média ± EPM. (***) $p=0.0005$; (****) $p<0.0001$)

5.6. Crises tônico-clônicas e eventos de apneia

Durante a crise tônico-clônica, observamos consistentemente a contração tônica do diafragma, como demonstrado na Figura 5.6. O DIA_{EMG} Peak Amp aumentou significativamente (12.03 ± 1.7 ; $p < 0.0001$) em comparação com a fase pós-injeção de PTZ (Figura 5.6 B). No entanto, é essencial observar que uma proporção significativa dos animais (cinco de sete) que desenvolveram crises tônico-clônicas morreu devido a uma parada respiratória após o término do período ictal. Nestes casos, o evento fatal foi marcado por uma apneia grave seguida por uma parada respiratória precedendo a assistolia terminal (Figura 5.6 A₁).

Em contraste, os dois animais que sobreviveram a essas crises exibiram *jerks* mioclônicos consecutivos após o evento tônico e, notavelmente, a atividade respiratória foi retomada logo após o evento tônico (Figura 5.7 A₁). Ao comparar eventos fatais e não fatais, não observamos diferenças na duração das apneias nem na amplitude da contração tônica do DIA_{EMG}. A duração da apneia de eventos fatais foi de $28.01 (\pm 2.67)$ segundos ($n=5$), enquanto a duração da apneia de eventos não fatais foi de $24.9 (\pm 8.25)$ segundos ($n=2$). O DIA_{EMG} Peak Amp dos eventos tônico-clônicos que resultaram em morte foi de $11.5 (\pm 2.05)$, e os animais que não morreram apresentaram uma DIA_{EMG} Peak Amp de $11.25 (\pm 2.92)$ (Figura 5.7 B e C).

Comparando eventos tônico-clônicos e crises clônicas, em termos de duração da apneia, é digno de nota que durante crises tônico-clônicas, os animais experimentaram apneias graves e duradouras, com aproximadamente $27.12 (\pm 2.64)$ segundos, o que é significativamente ($p < 0.0001$) mais longo do que as apneias observadas nos eventos de crises clônicas. Durante as clonias, as apneias foram aproximadamente seis vezes mais curtas, com uma duração de $4.569 (\pm 0.46)$ segundos em comparação com eventos tônico-clônicos, como ilustrado na Figura 5.6 C.

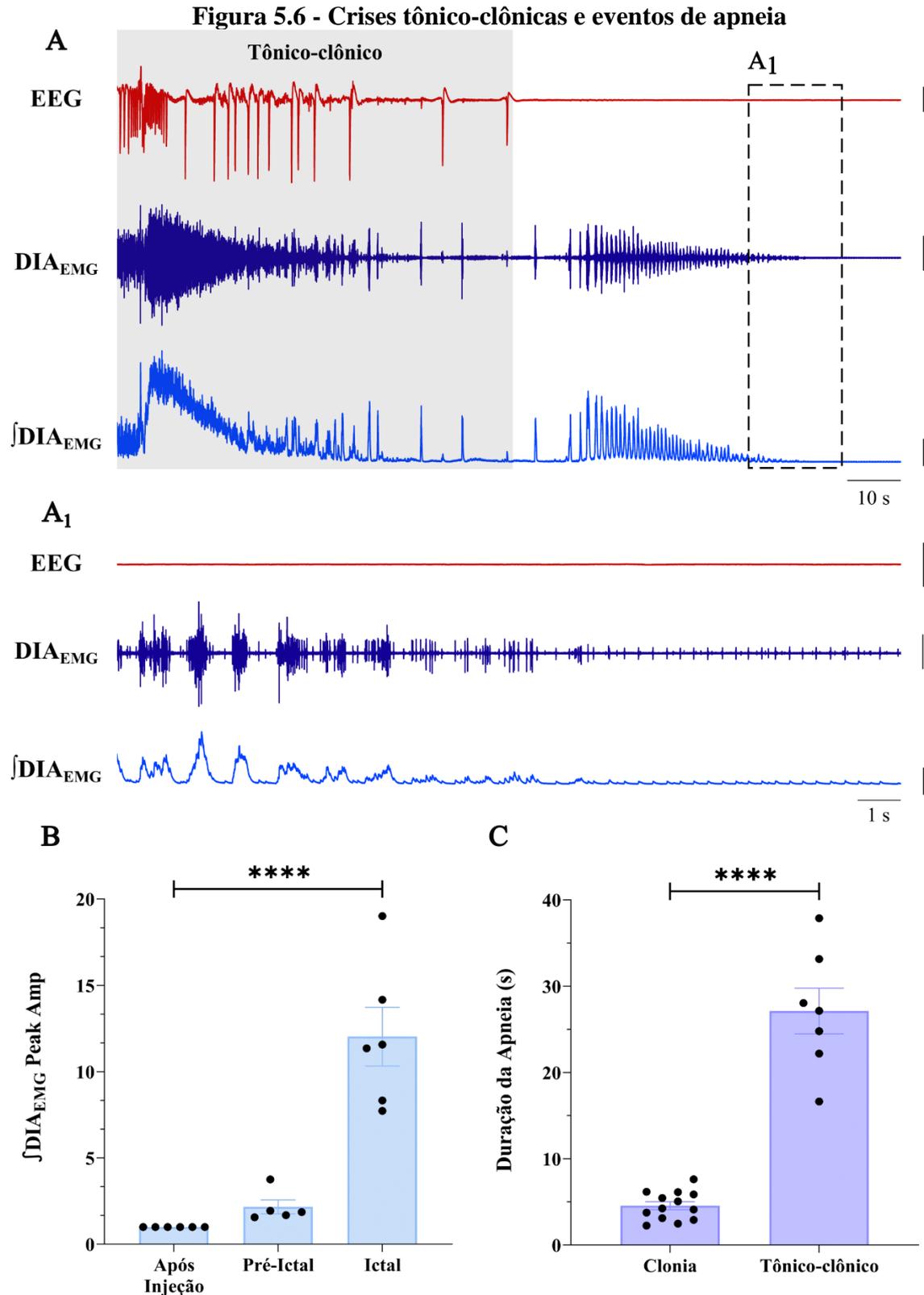


Figura 5.6: (A) Traçado representativo de um animal dos registros de EEG, DIA_{EMG} e ∫DIA_{EMG} (de cima para baixo, respectivamente). O retângulo cinza delimita a duração da crise. (A₁) Traçado expandido mostrando a apneia terminal ocorrendo antes da assistolia terminal. (B) Dados do grupo para a mudança relativa do DIA_{EMG} Peak Amp 30 segundos após a injeção de PTZ, nos momentos pré-ictal e ictal. (C) Dados do grupo para a duração da apneia durante a crises clônicas e tônico-clônicas. Cada ponto representa um animal e os dados foram expressos como média ± EPM. Diferença da duração da apneia foi calculada usando um teste t não pareado. (****p<0.0001)

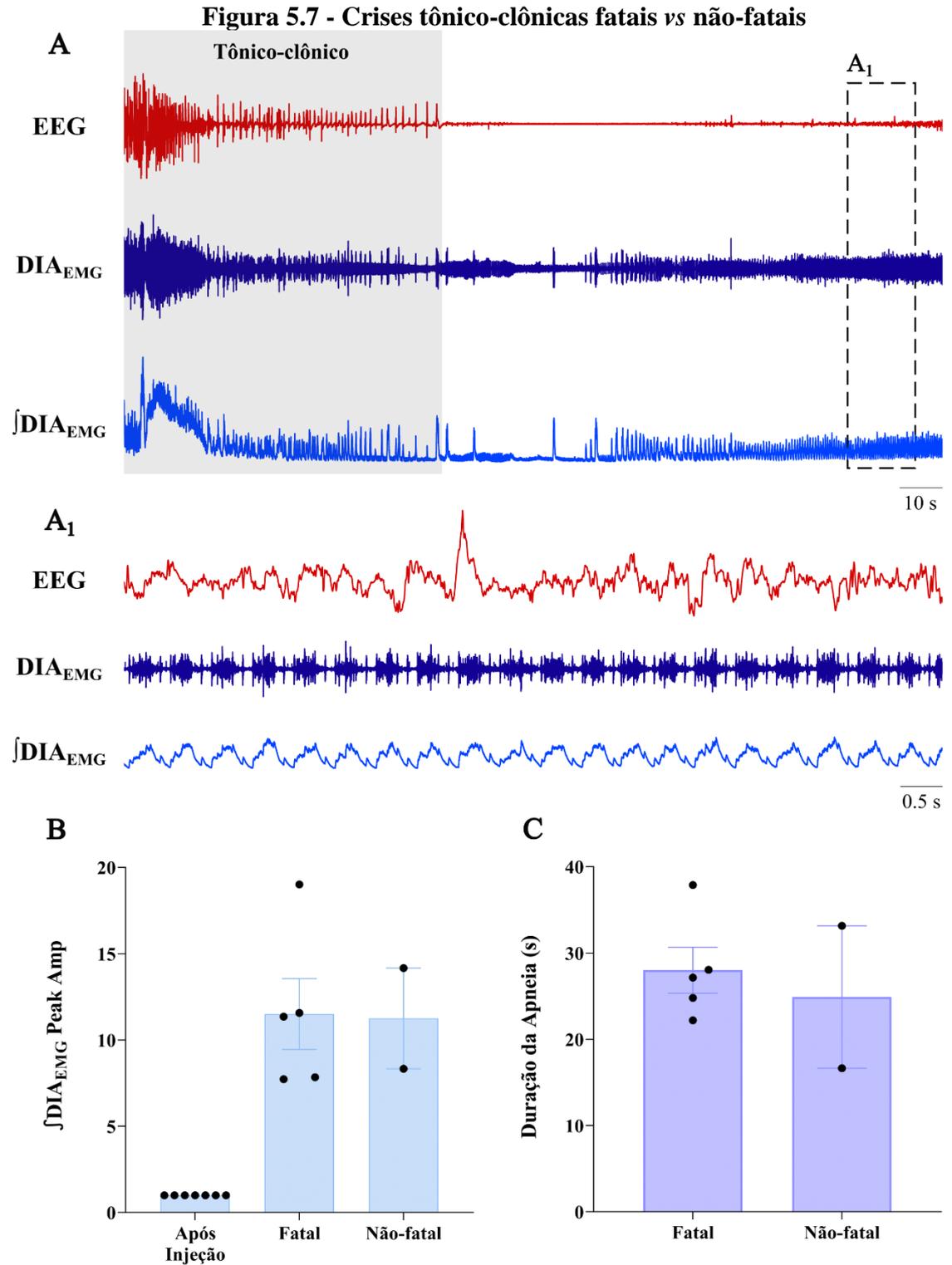


Figura 5.7: (A) Traçado representativo de um animal dos registros de EEG, DIA_{EMG} e ∫DIA_{EMG} (de cima para baixo, respectivamente). O retângulo cinza delimita a duração da crise. (A₁) Traçado expandido mostrando a recuperação da atividade respiratória após a crise. (B) Dados do grupo mostrando o DIA_{EMG} Peak Amp dos animais que morreram e dos que não morreram após a crise. Não há uma diferença entre os grupos. (C) Dados do grupo para a duração da apneia ictal entre os animais que morreram e os que não morreram após a crise. Também não há uma diferença entre os grupos. Cada ponto representa um animal e os dados foram expressos como média ± EPM.

6. Materiais e Métodos – *Crises Repetidas*

6.1. Animais experimentais e Aprovação do Comitê de Ética

Foram utilizados ratos *Wistar* adultos (n=22), com massa corporal entre 260 e 360 gramas, provenientes do CEBIO/ICB e do Biotério Central, da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do DFIB, a uma temperatura ambiente de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com as luzes acesas às 7 horas e apagadas às 19 horas. Os animais foram alojados em caixas coletivas de polipropileno (35 x 50 x 17 cm), com água e comida *ad libitum*, com um máximo de 5 animais por caixa. Todos os procedimentos foram realizados durante o período claro (entre 8 horas e 16 horas).

A manipulação dos animais e todos os protocolos experimentais foram conduzidos seguindo as diretrizes do CONCEA e todos os experimentos foram aprovados pela CEUA da UFMG, com protocolo de nº 279/2022.

6.2. Medida de ventilação pulmonar (pletismografia de corpo inteiro)

A ventilação pulmonar (\dot{V}_E) dos animais foi medida através do método de pletismografia de corpo inteiro [67,68]. O método barométrico se baseia no princípio de que a pressão interna de uma câmara fechada oscila de acordo com cada inspiração e expiração do animal. Essa medida fornece um dado preciso de volume corrente (V_T), desde que as variáveis-chave sejam medidas corretamente (temperaturas ambiente e interna do animal, umidade do ar e pressão barométrica).

Para a realização da medida de \dot{V}_E , o fluxo de ar da câmara de pletismografia foi interrompido momentaneamente (durante aproximadamente 3 minutos) e a câmara foi completamente vedada. A oscilação de pressão causada por cada inspiração foi captada pelo transdutor de pressão (ML141 Spirometer, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália), o sinal foi amplificado e digitalizado (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália) e a aquisição do sinal foi feita no software LabChart 7. A calibração do sistema foi feita através da injeção de 1 mL de ar dentro da câmara. As variáveis medidas foram FR, V_T e a \dot{V}_E foi obtida através do produto da FR e do V_T ($\dot{V}_E = \text{FR} \cdot V_T$).

6.3. Protocolo de indução de crises repetidas

As crises convulsivas repetidas foram induzidas via administração i.p. de PTZ em uma dose subconvulsivante de 40 mg/kg. A escolha da dose foi feita com base em testes do nosso grupo de pesquisa realizados anteriormente, conforme será discutido na Seção 8. As injeções foram dadas em dias alternados até a 10ª injeção, totalizando 19 dias de tratamento. O PTZ foi

dissolvido à fresco (1 mg/mL) em salina estéril 0,9% imediatamente antes do experimento e foi aplicado em um volume de 1 mL/kg. O grupo controle recebeu o mesmo número de injeções (de salina estéril 0,9%), no mesmo horário (Figura 6.1 A).

Após as injeções, o comportamento dos animais foi observado durante no mínimo 20 minutos e o escore da crise convulsiva foi anotado (de acordo com a Tabela 4.1). À medida que o tratamento avançava, as crises tendiam a se tornar mais severas, como era esperado. Dessa maneira, após três crises consecutivas de escore 5, a ventilação dos animais foi analisada. Um dia após o fim do tratamento, a ventilação dos animais foi analisada novamente, conforme o item 6.4.

6.4. Protocolo das ventilações e exposição à hipercapnia

As ventilações foram realizadas em dois momentos durante o protocolo de indução de crises convulsivas repetidas. A primeira foi realizada após os animais desenvolverem três crises consecutivas de escore 5, como dito anteriormente. No entanto, devido à variabilidade biológica, nem todos os animais cumpriram esse requisito e não houve um número padrão mínimo de injeções para que o escore 5 fosse alcançado. A segunda ventilação foi realizada um dia após a 10^a injeção em todos os animais.

O protocolo de ambas as ventilações seguiu da seguinte forma (Figura 6.1 B): a temperatura retal dos animais foi aferida e, em seguida, eles foram colocados dentro da caixa de pletismografia (5L; 18,5 cm de diâmetro e 18 cm de altura; Bonther, Ribeirão Preto, SP, Brasil), ventilada com ar ambiente a uma taxa de 2000 mL·min⁻¹. Nessa condição, os animais puderam aclimatar ao novo ambiente durante pelo menos 40 minutos. Após a verificação que o animal estava bem aclimatado, a ventilação do ar ambiente foi registrada por 3 minutos, conforme explicado em 6.2. Em seguida, foi iniciada a exposição à hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂ e 72% N₂, com fluxo de 2000 mL·min⁻¹) durante 20 minutos, e a ventilação em hipercapnia foi registrada por 3 minutos. A temperatura ambiente da caixa foi registrada após o término da medida da ventilação. Por fim, a temperatura retal do animal foi aferida novamente e ele foi devolvido à caixa coletiva.

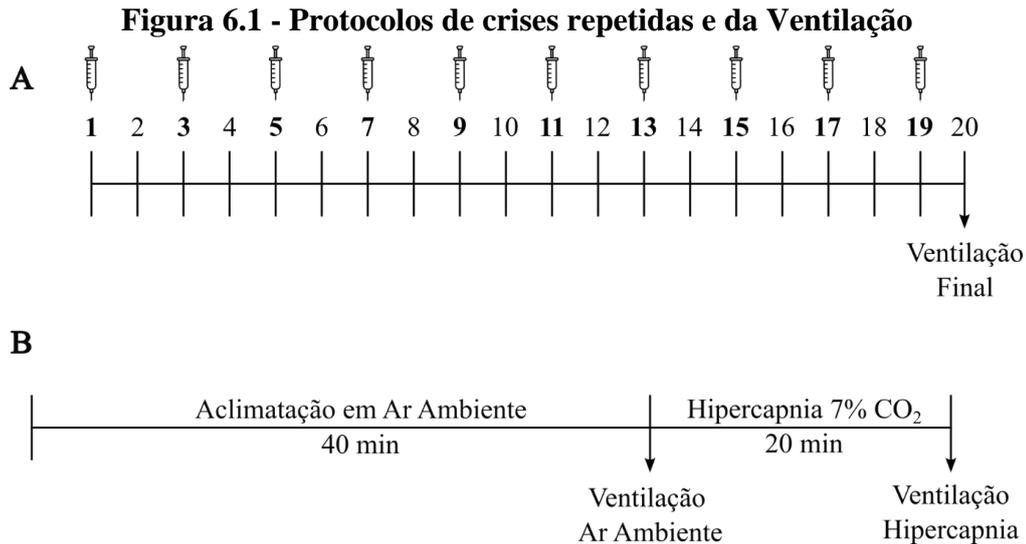


Figura 6.1: (A) Protocolo de indução das crises repetidas. As injeções (tanto de PTZ quanto de salina) foram dadas em dias alternados, como indicado pelas seringas esquemáticas. Um dia após a última injeção, a ventilação final dos animais foi analisada. (B) Protocolo da ventilação.

6.5. Análise dos dados e Estatística

As análises das ventilações, tanto em normocapnia quanto em hipercapnia foram realizadas em períodos de vigília calma (Figura 6.2). Para cada trecho considerado adequado, foram coletados dados de: pico da amplitude, tempo entre cada pico e número de picos. Isso nos fornece informações sobre FR, V_T e, conseqüentemente, \dot{V}_E . Os dados foram expressos como mudança relativa comparada com o período basal (normocapnia). A análise da resposta à hipercapnia foi separada da seguinte forma:

- i)* Animais que desenvolveram três crises consecutivas de escore 5 (Seção 7.1);
- ii)* Após a 10^a injeção, todos os ratos foram separados em três grupos: salina, animais que tiveram uma prevalência de crises recorrentes de escore baixo (< 5) e animais que tiveram uma prevalência de crises recorrentes de escore máximo (5) (Seção 7.2).

Para examinar as modificações em \dot{V}_E , V_T e FR nos distintos conjuntos, aplicou-se uma ANOVA two-way de medidas repetidas, seguida pelo teste post hoc de múltiplas comparações de Tukey. Significância foi atribuída aos valores com $p < 0.05$.

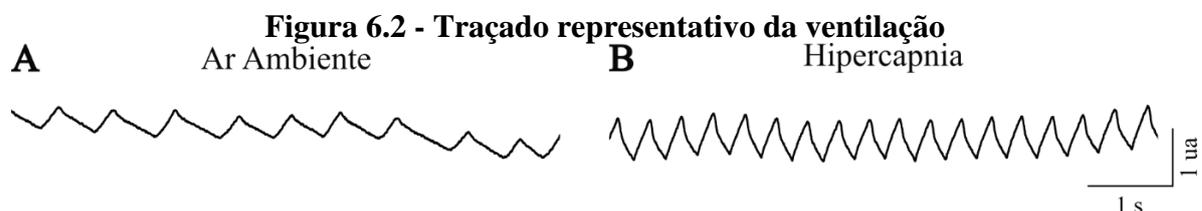


Figura 6.2: Traçado representativo de uma medida de ventilação de um animal controle. (A) Ventilação em normocapnia. (B) Ventilação em hipercapnia. É possível observar visualmente o aumento do V_T e da FR durante a exposição à hipercapnia.

7. Resultados – *Crises Repetidas*

7.1. Resposta à hipercapnia após três crises consecutivas de escore 5

Somente cinco animais desenvolveram três crises seguidas de escore 5. Durante a exposição à hipercapnia, a \dot{V}_E apresentou um aumento em ambos os grupos (2.96 ± 0.3 e 2.56 ± 0.2) para o grupo salina e para o grupo dos animais que desenvolveram crise, respectivamente, sem diferença estatística entre eles (Figura 7.1 A). Quanto ao V_T durante a hipercapnia, também foi possível observar um aumento (2.08 ± 0.3 e 1.91 ± 0.1) dos animais controle e dos que apresentaram três crises consecutivas, respectivamente, também sem diferença estatística entre os grupos (Figura 7.1 B). Por fim, a FR aumentou em ambos os grupos, salina e com três crises consecutivas severas (1.43 ± 0.1 e 1.34 ± 0.1 , respectivamente), sem uma diferença estatística entre os grupos (Figura 7.1 C). Dessa forma, é possível afirmar que o aumento da \dot{V}_E de ambos os grupos se deu devido a um aumento tanto do V_T quanto da FR. Como não houve diferença entre os grupos, é possível concluir que mais eventos de crises são necessários para induzir alguma mudança na quimiorrecepção.

Figura 7.1 - Ventilação após três crises severas consecutivas

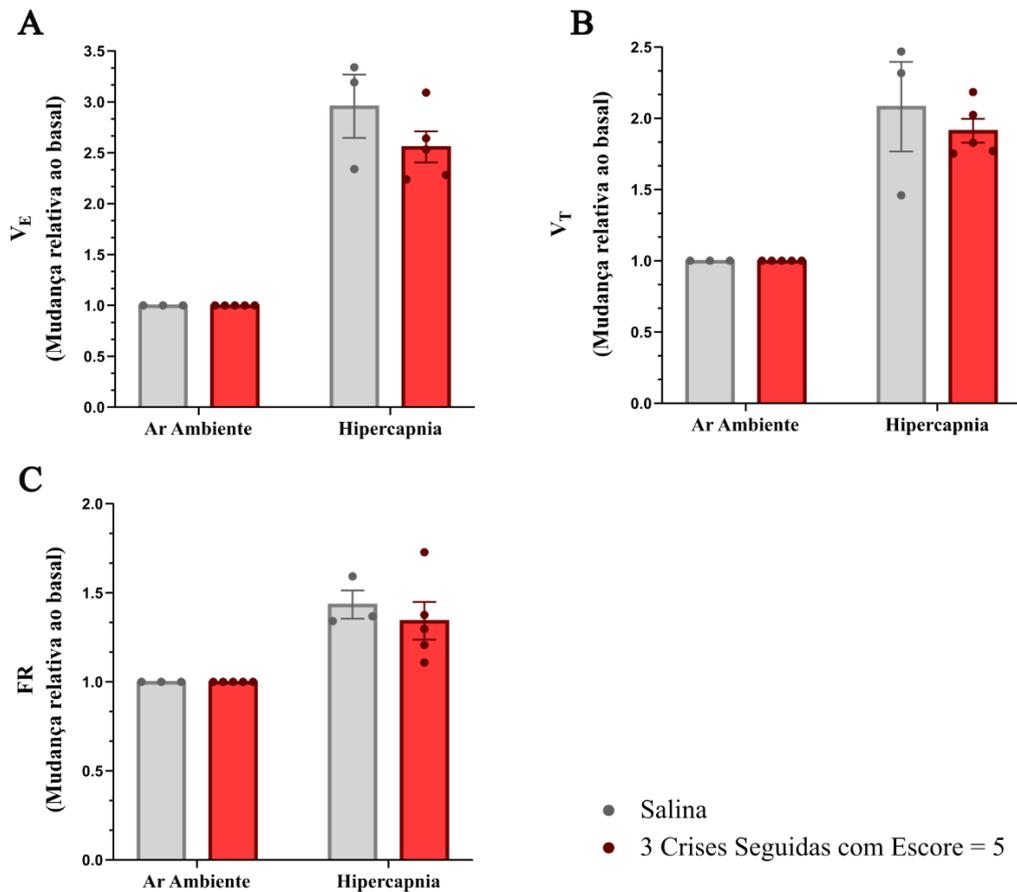


Figura 7.1: Resposta relativa à hipercapnia após três crises de maior escore consecutivas, em que (A) Ventilação, (B) Volume corrente e (C) Frequência Respiratória. Em cinza estão representados os animais controle (n=3), que receberam a injeção de salina e em vermelho são os animais que desenvolveram as três crises de escore 5 seguidas (n=5). Cada ponto representa um animal e os dados foram expressos como média \pm EPM.

7.2. Resposta à hipercapnia após as dez injeções de PTZ

Os dados a seguir são referentes às ventilações feitas após a décima injeção de PTZ (Figura 7.2). Quanto à \dot{V}_E , é possível observar que o grupo salina apresentou um aumento (2.82 ± 0.2) em resposta ao CO_2 , conforme o esperado. Comparado com o grupo salina, os animais que tiveram crises recorrentes brandas tiveram uma atenuação da \dot{V}_E (2.47 ± 0.1 ; $p < 0.05$). Porém, os animais que tiveram crises recorrentes severas (de escore 5) apresentaram uma maior atenuação da \dot{V}_E (2.39 ± 0.1 ; $p = 0.006$). Portanto, é possível observar que a recorrências de crises, tanto brandas quanto severas induz uma atenuação da ventilação (Figura 7.2 A).

A resposta relativa de V_T em resposta à hipercapnia apresentou a mesma tendência de mudança, mas sem significância estatística. O grupo salina apresentou um aumento de $1.98 (\pm 0.1)$ do V_T , os animais com crises recorrentes de baixo escore tiveram um aumento relativo de $1.96 (\pm 0.1)$ e, por fim, os animais que desenvolveram crises severas tiveram um aumento de $1.83 (\pm 0.1)$ (Figura 7.2 B).

Quanto à mudança da FR após a exposição à hipercapnia, o grupo salina apresentou um aumento de $1.44 (\pm 0.06)$. Os animais que desenvolveram crises brandas tiveram um menor aumento da FR, comparado com o grupo controle, de $1.26 (\pm 0.04$; $p = 0.009$). Por fim, os animais com crises recorrentes de alto escore também apresentaram um menor aumento da FR, comparado com o grupo salina, de $1.31 (\pm 0.06$; $p < 0.05$) (Figura 7.2 C).

Dessa maneira, é possível observar que a atenuação da \dot{V}_E após a exposição a 7% CO_2 nos animais que apresentaram crises recorrentes, tanto de baixo escore quanto de alto, foi devida a um menor aumento da FR.

Figura 7.2 - Ventilação após a última injeção de PTZ

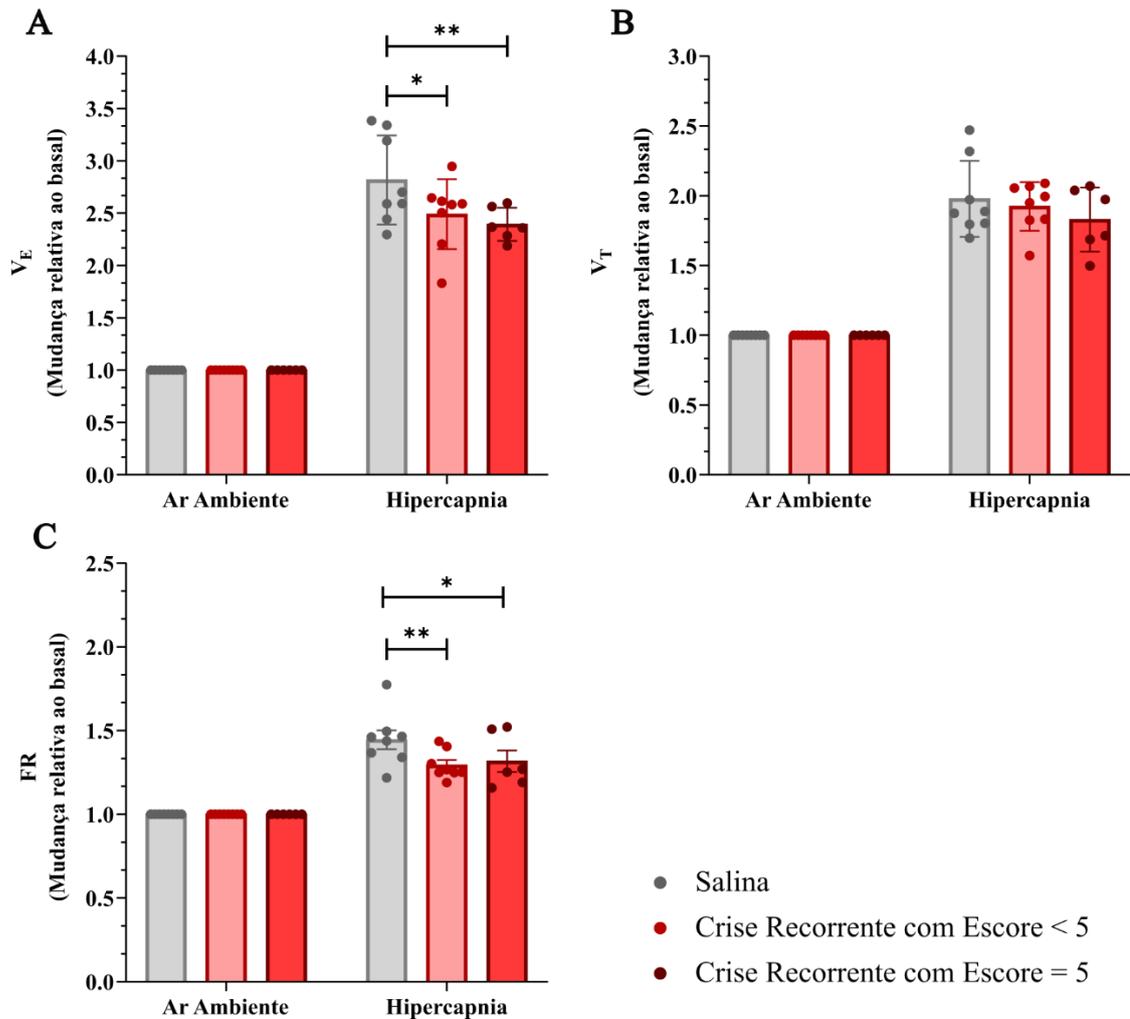


Figura 7.2: Resposta relativa à hipercapnia após a última injeção de PTZ, em que (A) Ventilação, (B) Volume corrente e (C) Frequência Respiratória. Em cinza estão representados os animais do grupo salina (n=8), em vermelho claro os animais que tiveram crises repetidas de escore baixo (n=8) e, por fim, em vermelho escuro estão representados os animais que tiveram crises recorrentes de escore máximo (5) (n=6). Cada ponto representa um animal e os dados foram expressos como média \pm EPM. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

8. Discussão

No presente estudo, utilizamos o PTZ para induzir crises convulsivas agudas e crônicas em ratos adultos e os respectivos resultados serão discutidos separadamente nessa seção. Nas crises agudas, investigamos a atividade respiratória em diferentes graus de severidade de eventos convulsivos. Em geral, nossos resultados indicam que, à medida que a gravidade da convulsão aumenta, a disfunção respiratória se torna mais pronunciada. Especificamente, observamos uma atenuação leve na respiração durante crises de baixa gravidade, como as do tipo ausência e *jerks* mioclônicos. Notavelmente, durante crises do tipo ausência, observamos uma diminuição acentuada na frequência respiratória. Por outro lado, as crises mais graves promoveram apneias ictais e supressão da atividade respiratória, caracterizada por uma apneia de longa duração durante crises tônico-clônicas. Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro conjunto de dados a caracterizar sistematicamente a atividade respiratória em crises agudas induzidas por PTZ, abrangendo diversas manifestações comportamentais de gravidade das crises.

O PTZ é um modelo de indução de crises generalizadas com início multifocal e evoca atividade tanto no telencéfalo (clônico) quanto no diencéfalo (tônico), semelhante ao observado em convulsões generalizadas secundárias em humanos [48,54]. Ele foi utilizado pela primeira vez em 1934 (citado por [69]) como droga convulsivante e desde então é empregado na pesquisa. O perfil farmacocinético do PTZ inclui alta biodisponibilidade, distribuição rápida para órgãos, latência breve de ação, permeabilidade da barreira hematoencefálica com rápida absorção cerebral e a capacidade de estimular atividade epileptogênica ao inibir a transmissão mediada pelo GABA [52,70–73]. As convulsões induzidas por PTZ estão bem documentadas na literatura, são de fácil replicação e comumente utilizadas para triagem de medicamentos anticonvulsivantes [43,48]. Além disso, a vantagem desse modelo experimental reside na conveniência de sua aplicação sistêmica (administração i.p. ou s.c.), eliminando a necessidade de cirurgia para uma preparação complexa, e consistentemente desencadeia eventos de crises dentro de um intervalo de tempo relativamente curto.

Importante ressaltar que a primeira etapa do nosso estudo revelou que as convulsões agudas induzidas por PTZ replicam eventos respiratórios semelhantes aos observados em casos de SUDEP, nos quais a parada respiratória e a apneia terminal precederam a assistolia [31]. No entanto, a ampla circulação do PTZ e seu potencial para interferir nos circuitos neuronais do tronco encefálico envolvidos no controle da respiração, através da inibição da neurotransmissão de GABA, pode representar uma desvantagem. Há evidências que mostram um efeito excitatório do PTZ na respiração [74,75], mais especificamente, em coelhos anestesiados, a

aplicação focal de PTZ no bulbo induziu um aumento na atividade de neurônios respiratórios [74]. Dessa maneira, é possível que as alterações respiratórias observadas são devidas aos efeitos do PTZ e a magnitude deles é desafiadora de prever. No entanto, nossos resultados demonstram que durante crises do tipo ausência, clônicas e tônicas, a atividade respiratória variou rapidamente e esteve intimamente ligada aos eventos ictais. Isso sugere que o sistema de controle respiratório permanece responsivo à interferência causada pelos eventos convulsivos.

Atualmente, há um número limitado de estudos que mediram diretamente a atividade do diafragma durante convulsões [55], enquanto muitos outros avaliaram a atividade respiratória ictal por meio de diferentes métodos, como pletismografia de corpo inteiro, pneumotacógrafo, saturação de oxigênio no sangue, ETCO_2 , pletismografia de indução ou análise de vídeo [31–36,76,77]. Nossa metodologia nos permitiu medir o principal músculo inspiratório, que representa a saída motora inspiratória direta, e isso tem duas considerações importantes:

- i)* Nossos resultados revelam que eventos de apneia durante crises tônicas (apneia tônica) são consequência da contração sustentada do principal músculo inspiratório, o diafragma. Essa atividade muscular tônica interrompe as contrações rítmicas regulares necessárias para movimentos torácicos eficazes e, por fim, interrompe a ventilação alveolar. Embora conceitualmente simples, as medições diretas do músculo inspiratório (registros de EMG) durante convulsões são pouco relatadas tanto para humanos quanto para roedores. Nossas observações da apneia na fase tônica em ratos adultos estão em acordo com achados semelhantes em camundongos [55].
- ii)* Eventos de apneia durante crises clônicas poderiam ter passado despercebidos, devido aos intensos artefatos de movimento, se a atividade respiratória fosse medida pelo método de pletismografia. Portanto, o DIA_{EMG} revelou que eventos de apneia estão presentes tanto em crises clônicas quanto tônicas. No entanto, as apneias durante eventos clônicos não apresentaram contração diafragmática tônica, sugerindo mecanismos distintos subjacentes à ocorrência de apneia em comparação com eventos de crises tônicas. Sugestivamente, pode-se hipotetizar que os mecanismos de apneia central (falha da rede respiratória central em gerar uma saída motora adequada, em vez de apneia obstrutiva) estão associados a eventos clônicos. Apesar de evidências existentes em humanos indicarem o papel inibitório da amígdala na atividade respiratória durante crises [78], os mecanismos do tronco cerebral responsáveis pelas apneias centrais em crises clônicas

induzidas por PTZ ainda são desconhecidos e precisam ser explorados tanto em ratos quanto em camundongos.

A rede respiratória do tronco cerebral opera de maneira altamente interconectada, interagindo com outros elementos, como o sistema límbico, neocórtex e hipotálamo para responder a diversas mudanças metabólicas, comportamentais e ambientais que podem influenciar a respiração (como sono, exercício, emoções e locomoção) [3,6,79]. No entanto, nosso presente estudo possui limitações em elucidar os mecanismos exatos da parada respiratória induzida por crises, ou como convulsões induzidas por PTZ afetam a rede respiratória do tronco encefálico. Evidências neuroanatômicas anteriores mostraram que doses subconvulsivas de PTZ resultam em marcação de c-Fos, principalmente no hipotálamo e tálamo. No entanto, à medida que as doses aumentam, desencadeando crises clônicas, a marcação de c-Fos também aparece no hipocampo, estriado e tronco encefálico (incluindo o NTS) [80].

Essas evidências indicam que a gravidade da crise está relacionada à ativação do tronco encefálico bulbar, sugerindo que a falha respiratória induzida por crise no modelo de PTZ pode envolver um recrutamento direto de regiões relacionadas à respiração no tronco encefálico. Além disso, dois mecanismos gerais potenciais, não sináptico e sináptico, têm sido discutidos na literatura como contribuintes para a falha respiratória associada a um evento ictal. O mecanismo não sináptico está relacionado à chamada despolarização espalhada (do inglês, *spreading depolarization*, SD), que é uma onda autorregeneradora de despolarização em neurônios associada a níveis aumentados de potássio extracelular e glutamato [81,82]. Durante a SD, a membrana é despolarizada de uma maneira que impede a geração de potenciais de ação, levando à supressão do EEG e à desativação da rede neuronal [82,83]. Estudos em camundongos mutantes *Kcna1* e *Scn1a* (genes que codificam os canais Kv1.1 de potássio e Nav1.1 de sódio, respectivamente), mostraram que crises induzidas quimicamente causam uma onda SD no bulbo dorsal, acompanhada de achatamento do EEG, apneia, bradicardia e assistolia [82].

Por outro lado, mecanismos sinápticos podem contribuir para a supressão respiratória (ou apneia) durante crises, nos quais a ativação sináptica de projeções inibitórias (sub)corticais para os centros respiratórios do tronco encefálico pode desempenhar um papel vital [78]. Nesse contexto, evidências consistentes sugerem que quando as crises se espalham para a amígdala, ocorre apneia central, e a estimulação elétrica dessa região também induz apneia [78]. Além

disso, lesões eletrolíticas da amígdala em camundongos DBA/1 (modelo animal de crise audiogênica) reduziram significativamente a incidência de parada respiratória ictal, indicando o papel crucial dessa região em comprometer a atividade respiratória durante as crises [46].

Em um importante estudo, Ryvlin e colaboradores (2013) conduziram registros em um EMUs, revelando que todos os casos documentados de SUDEP exibiram parada respiratória terminal precedendo a assistolia terminal [31]. Além disso, Wenker e colaboradores (2021) demonstraram que em camundongos mutantes *Scn8a* (mutação comumente encontrada em pacientes vítimas de SUDEP), a principal causa de morte foi a apneia, iniciada durante a crise e que continuou por vários minutos até a assistolia terminal [55]. Da mesma forma, Buchanan et al. (2014) mostraram que em um modelo de eletrochoque máximo (MES) a cessação da respiração durante as crises precedia a assistolia terminal, ocorrendo após a apneia terminal [32]. Essas evidências em conjunto fortalecem a hipótese de que a parada respiratória é um evento fundamental na fisiopatologia do SUDEP.

Nesse cenário, o uso de modelos animais tem sido essencial para avançar na compreensão da atividade respiratória na epilepsia e na SUDEP. O presente estudo, embora não seja um modelo de epilepsia em si, utiliza crises agudas induzidas por PTZ, reproduzindo características pertinentes de crises epiléticas. Esse modelo segue uma sequência bem descrita de eventos que culminam em crises tônico-clônicas generalizadas. Especialmente, as convulsões agudas induzidas por PTZ recapitulam eventos relacionados a casos de SUDEP, nos quais a parada respiratória com apneia prolongada precede a assistolia, e a torna a principal causa de morte. Portanto, o modelo de PTZ agudo oferece uma plataforma conveniente para estudar a atividade respiratória ictal, facilitando uma exploração mais aprofundada dos mecanismos envolvidos nas alterações respiratórias ictais.

A segunda etapa do trabalho envolveu crises induzidas cronicamente com PTZ, e foi possível observar que somente a ocorrência de três crises consecutivas severas não é suficiente para induzir mudanças na quimiorrecepção dos animais. É necessário que haja uma certa recorrência de crises convulsivas para que uma mudança na ventilação dos animais seja observada.

O estudo de crises convulsivas repetidas é necessário quando se leva em conta o número de pacientes com epilepsia que são considerados refratários ao tratamento farmacológico. Esses pacientes apresentam crises recorrentes e descontroladas e, além disso, são mais susceptíveis a morrerem de SUDEP [14,23,31,36]. Além disso, Sainju e colaboradores (2019) demonstraram

que alguns pacientes refratários apresentam uma atenuação da ventilação em resposta ao aumento do ETCO_2 durante o repouso [36], o que indica uma menor quimiossensibilidade ao CO_2 . Um paciente em específico desse estudo apresentou ausência completa de quimiossensibilidade ao CO_2 e, onze meses após o estudo, faleceu após uma crise epilética e sua morte foi considerada como SUDEP. Isso mostra indícios de que crises convulsivas recorrentes podem, de alguma forma, afetar a quimiorrecepção e isso pode contribuir para o desfecho fatal de casos de SUDEP.

O fenótipo de atenuação da quimiorrecepção já foi observado em modelos animais de crises, como o WAR e camundongos DBA/1 (ambos modelos de crises audiogênicas) [45,47], e modelos animais com mutações genéticas [33,44]. No entanto, até onde sabemos, a quimiossensibilidade ao CO_2 não foi avaliada após crises repetidas induzidas por PTZ. Diante disso, a proposta da segunda etapa deste trabalho foi evocar crises repetidas utilizando o PTZ e avaliar se esse modelo também induz alguma atenuação da ventilação após a exposição ao CO_2 .

Nós utilizamos a dose de 40 mg/kg para induzir as crises repetidas nos ratos *Wistar*, que foi escolhida após testes anteriores feitos pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando o mesmo protocolo. Anteriormente, utilizamos a dose subconvulsivante de 30 mg/kg para induzir as crises repetidas e, conforme visto na primeira etapa do trabalho, essa dose só foi capaz de evocar crises do tipo ausência. No entanto, como nosso objetivo também foi avaliar se o fator “severidade de crises” participa das mudanças na quimiorrecepção, optamos por uma dose um pouco maior e que, somente ao longo do tratamento, evocasse crises de escore mais elevado.

Nos primeiros resultados, é possível observar que a resposta ventilatória à hipercapnia (HCVR) após três crises consecutivas de escore severo não foi diferente da resposta do grupo salina, o que indica que somente esse fator não é suficiente para induzir mudanças na quimiorrecepção. Além disso, devido à variabilidade biológica, dentre os cinco animais que atenderam esse critério, não houve um número padrão mínimo de injeções/crises para que se chegasse à terceira crise consecutiva de escore 5.

No segundo grupo de resultados, vimos que após as 10 injeções de PTZ houve uma atenuação da HCVR, tanto dos animais que apresentaram uma recorrência maior de crises brandas (escore < 5), quanto dos que tiveram uma prevalência de crises severas (escore 5). Isso e os primeiros resultados indicam que o fator “número de crises” tem um papel mais relevante na atenuação da HCVR.

Diante disso, o uso de modelos animais de crises repetidas se faz necessário, visando uma melhor compreensão das consequências que a recorrência das crises convulsivas induzem. Embora nosso modelo, novamente, não seja de epilepsia (visto que os animais não apresentam crises espontâneas), reproduzimos fenótipos que são encontrados tanto em pacientes com epilepsia, quanto em outros modelos animais para o estudo dessa doença. Nossos experimentos ainda serão expandidos e possíveis mecanismos moleculares e funcionais serão explorados.

9. Conclusões

Em resumo, nosso estudo revelou que crises agudas induzidas por PTZ em ratos adultos apresentaram uma intensificação da disfunção respiratória com o aumento da gravidade das crises. Convulsões de baixa gravidade, incluindo aquelas de ausências e mioclônicas, mostraram distúrbios respiratórios leves, especialmente com uma diminuição notável na frequência respiratória. Por outro lado, as crises mais graves, como as clônicas e tônico-clônicas, induziram apneias ictais e supressão completa da atividade respiratória, incluindo apneias prolongadas durante a fase tônica. Importante destacar que a parada respiratória induzida pela crise precedeu a assistolia em casos de crises tônicas fatais. Essas descobertas contribuem para uma melhor compreensão da dinâmica respiratória durante diferentes severidades de crises induzidas agudamente por PTZ. Esses dados impactam significativamente e avançam na caracterização do comportamento respiratório rítmico em um modelo animal de crises agudas, sendo essencial para avançar no nosso conhecimento atual sobre o controle respiratório durante as convulsões.

Além disso, nosso trabalho também revelou que crises induzidas cronicamente por PTZ promovem uma atenuação da quimiorrecepção ao CO₂, mas essa atenuação só ocorre quando há uma recorrência das crises convulsivas. Nosso dado indica que não é a apenas a severidade das crises recorrentes que induzem alterações, apesar ser um fator relevante. Esses achados complementam o conhecimento dos efeitos de crises induzidas cronicamente por PTZ e abrem portas para estudos futuros que busquem elucidar possíveis mecanismos por trás desses efeitos.

10. Referências Bibliográficas

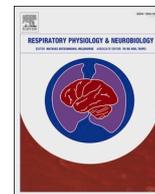
- [1] Butler JE, Hudson AL, Gandevia SC. The neural control of human inspiratory muscles. *Prog Brain Res* 2014;209:295–308. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63274-6.00015-1>.
- [2] Hérent C, Diem S, Usseglio G, Fortin G, Bouvier J. Upregulation of breathing rate during running exercise by central locomotor circuits in mice. *Nat Commun* 2023;14:2939. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38583-6>.
- [3] Del Negro CA, Funk GD, Feldman JL. Breathing matters. *Nat Rev Neurosci* 2018;19:351–67. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0003-6>.
- [4] Widdicombe JG. Pulmonary And Respiratory Tract Receptors. *J Exp Biol* 1982;100:41–57. <https://doi.org/10.1242/jeb.100.1.41>.
- [5] Gonye EC, Bayliss DA. Criteria for central respiratory chemoreceptors: experimental evidence supporting current candidate cell groups. *Front Physiol* 2023;14:1241662. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1241662>.
- [6] Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. BREATHING: Rhythmicity, Plasticity, Chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 2003;26:239–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131103>.
- [7] Guyenet PG, Mulkey DK, Stornetta RL, Bayliss DA. Regulation of Ventral Surface Chemoreceptors by the Central Respiratory Pattern Generator. *J Neurosci* 2005;25:8938–47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2415-05.2005>.
- [8] Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, Kang BJ, Chang DA, West GH, et al. Expression of Phox2b by Brainstem Neurons Involved in Chemosensory Integration in the Adult Rat. *J Neurosci* 2006;26:10305–14. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2917-06.2006>.
- [9] Greer JJ, Funk GD. Respiration. In: Pfaff DW, editor. *Neurosci. 21st Century Basic Clin.*, New York, NY: Springer; 2013, p. 1423–62. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1997-6_49.
- [10] Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Bötzinger Complex: A Brainstem Region That May Generate Respiratory Rhythm in Mammals. *Science* 1991;254:726–9.
- [11] Chowdhuri S, Badr MS, Rowley JA, Chowdhuri S, Badr MS, Rowley JA. *Control of Breathing during Sleep: From Bench to Bedside*. 1st ed. CRC Press; 2022.
- [12] Zoccal DB, Paton JF, Machado BH. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36:1188–96. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05202.x>.
- [13] Nunan BLCZ. O papel do óxido nítrico no núcleo paraventricular do hipotálamo em condições de exercício e hipóxia. The role of nitric oxide in the paraventricular nucleus of the hypothalamus under exercise and hypoxia conditions 2020.
- [14] Devinsky O, Vezzani A, O’Brien TJ, Jette N, Scheffer IE, de Curtis M, et al. Epilepsy. *Nat Rev Dis Primer* 2018;4:1–24. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.24>.
- [15] Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014;55:475–82. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>.
- [16] Vos T, Allen C, Arora M, Barber RM, Bhutta ZA, Brown A, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 2016;388:1545–602. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31678-6).
- [17] Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach. *Epilepsia* 2010;51:883–90. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02481.x>.
- [18] Singh A, Trevick S. The Epidemiology of Global Epilepsy. *Neurol Clin* 2016;34:837–47. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.015>.

- [19] Kevin Pacheco-Barrios, Navarro-Flores A, Cardenas-Rojas A, de Melo PS, Uygur-Kucukseymen E, Alva-Diaz C, et al. Burden of epilepsy in Latin America and The Caribbean: a trend analysis of the Global Burden of Disease Study 1990 – 2019. *Lancet Reg Health - Am* 2022;8:100140. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.100140>.
- [20] Hauser WA, Beghi E. First seizure definitions and worldwide incidence and mortality. *Epilepsia* 2008;49:8–12. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01443.x>.
- [21] Devinsky O, Spruill T, Thurman D, Friedman D. Recognizing and preventing epilepsy-related mortality: A call for action. *Neurology* 2016;86:779–86. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002253>.
- [22] Chen Z, Brodie MJ, Liew D, Kwan P. Treatment Outcomes in Patients With Newly Diagnosed Epilepsy Treated With Established and New Antiepileptic Drugs: A 30-Year Longitudinal Cohort Study. *JAMA Neurol* 2018;75:279. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3949>.
- [23] Devinsky O, Hesdorffer DC, Thurman DJ, Lhatoo S, Richerson G. Sudden unexpected death in epilepsy: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet Neurol* 2016;15:1075–88. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30158-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30158-2).
- [24] Nashef L, Garner S, Sander JW, Fish DR, Shorvon SD. Circumstances of death in sudden death in epilepsy: interviews of bereaved relatives. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:349–52. <https://doi.org/10.1136/jnnp.64.3.349>.
- [25] Joyal KG, Kreitlow BL, Buchanan GF. The role of sleep state and time of day in modulating breathing in epilepsy: implications for sudden unexpected death in epilepsy. *Front Neural Circuits* 2022;16.
- [26] Nilsson L, Farahmand BY, Persson PG, Thiblin I, Tomson T. Risk factors for sudden unexpected death in epilepsy: a case-control study. *Lancet Lond Engl* 1999;353:888–93. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)05114-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)05114-9).
- [27] Tomson T, Walczak T, Sillanpaa M, Sander JWAS. Sudden unexpected death in epilepsy: a review of incidence and risk factors. *Epilepsia* 2005;46 Suppl 11:54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00411.x>.
- [28] Hesdorffer DC, Tomson T, Benn E, Sander JW, Nilsson L, Langan Y, et al. Combined analysis of risk factors for SUDEP. *Epilepsia* 2011;52:1150–9. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02952.x>.
- [29] Shorvon S, Tomson T. Sudden unexpected death in epilepsy. *Lancet Lond Engl* 2011;378:2028–38. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60176-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60176-1).
- [30] Bozorgi A, Lhatoo SD. Seizures, Cerebral Shutdown, and SUDEP. *Epilepsy Curr* 2013;13:236–40. <https://doi.org/10.5698/1535-7597-13.5.236>.
- [31] Ryvlin P, Nashef L, Lhatoo SD, Bateman LM, Bird J, Bleasel A, et al. Incidence and mechanisms of cardiorespiratory arrests in epilepsy monitoring units (MORTEMUS): a retrospective study. *Lancet Neurol* 2013;12:966–77. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70214-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70214-X).
- [32] Buchanan GF, Murray NM, Hajek MA, Richerson GB. Serotonin neurones have anti-convulsant effects and reduce seizure-induced mortality. *J Physiol* 2014;592:4395–410. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.277574>.
- [33] Kim Y, Bravo E, Thirnbeck CK, Smith-Mellecker LA, Kim SH, Gehlbach BK, et al. Severe peri-ictal respiratory dysfunction is common in Dravet syndrome. *J Clin Invest* 2018;128:1141–53. <https://doi.org/10.1172/JCI94999>.
- [34] Dhaibar H, Gautier NM, Chernyshev OY, Dominic P, Glasscock E. Cardiorespiratory profiling reveals primary breathing dysfunction in *Kcna1*-null mice: Implications for sudden unexpected death in epilepsy. *Neurobiol Dis* 2019;127:502–11. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.04.006>.

- [35] Bateman LM, Li C-S, Seyal M. Ictal hypoxemia in localization-related epilepsy: analysis of incidence, severity and risk factors. *Brain* 2008;131:3239–45. <https://doi.org/10.1093/brain/awn277>.
- [36] Sainju RK, Dragon DN, Winnike HB, Nashelsky MB, Granner MA, Gehlbach BK, et al. Ventilatory response to CO₂ in patients with epilepsy. *Epilepsia* 2019;60:508–17. <https://doi.org/10.1111/epi.14660>.
- [37] Rugg-Gunn F, Duncan J, Hjalgrim H, Seyal M, Bateman L. From unwitnessed fatality to witnessed rescue: Nonpharmacologic interventions in sudden unexpected death in epilepsy. *Epilepsia* 2016;57 Suppl 1:26–34. <https://doi.org/10.1111/epi.13231>.
- [38] Hani AJ, Mikati HM, Mikati MA. Genetics of Pediatric Epilepsy. *Pediatr Clin North Am* 2015;62:703–22. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2015.03.013>.
- [39] Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Broeckhoven CV, Jonghe PD. De Novo Mutations in the Sodium-Channel Gene SCN1A Cause Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Am J Hum Genet* 2001;68:1327–32. <https://doi.org/10.1086/320609>.
- [40] Hampson JP, Lacuey N, Rani MS, Hampson JS, Simeone KA, Simeone TA, et al. Functional MRI Correlates of Carbon Dioxide Chemosensing in Persons With Epilepsy. *Front Neurol* 2022;13.
- [41] Mueller SG, Bateman LM, Laxer KD. Evidence for brainstem network disruption in temporal lobe epilepsy and sudden unexplained death in epilepsy. *NeuroImage Clin* 2014;5:208–16. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2014.06.010>.
- [42] Goldman AM, Buchanan G, Aiba I, Noebels JL. SUDEP Animal Models. In: Pitkänen A, Buckmaster PS, Galanopoulou AS, Moshé SL, editors. *Models Seizures Epilepsy Second Ed.*, Academic Press; 2017, p. 1007–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804066-9.00070-5>.
- [43] Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res* 2017;42:1873–88. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2222-z>.
- [44] Kuo F-S, Cleary CM, LoTurco JJ, Chen X, Mulkey DK. Disordered breathing in a mouse model of Dravet syndrome. *eLife* 2019;8:e43387. <https://doi.org/10.7554/eLife.43387>.
- [45] Faingold CL, Randall M, Tupal S. DBA/1 mice exhibit chronic susceptibility to audiogenic seizures followed by sudden death associated with respiratory arrest. *Epilepsy Behav* 2010;17:436–40. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2010.02.007>.
- [46] Marincovich A, Bravo E, Dlouhy B, Richerson GB. Amygdala lesions reduce seizure-induced respiratory arrest in DBA/1 mice. *Epilepsy Behav* 2021;121:106440. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.07.041>.
- [47] Granjeiro ÉM, da Silva GSF, Giusti H, Oliveira JA, Glass ML, Garcia-Cairasco N. Behavioral, Ventilatory and Thermoregulatory Responses to Hypercapnia and Hypoxia in the Wistar Audiogenic Rat (WAR) Strain. *PloS One* 2016;11:e0154141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154141>.
- [48] Bialer M, White HS. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:68–82. <https://doi.org/10.1038/nrd2997>.
- [49] Borowicz KK, Banach M. Antiarrhythmic drugs and epilepsy. *Pharmacol Rep* 2014;66:545–51. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.03.009>.
- [50] Uttl L, Hložek T, Mareš P, Páleníček T, Kubová H. Anticonvulsive Effects and Pharmacokinetic Profile of Cannabidiol (CBD) in the Pentylentetrazol (PTZ) or N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Models of Seizures in Infantile Rats. *Int J Mol Sci* 2021;23:94. <https://doi.org/10.3390/ijms23010094>.
- [51] Velisek L, Kubova H, Pohl M, Stankova L, Mares P, Schickerova R. Pentylentetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1992;346:588–91. <https://doi.org/10.1007/BF00169017>.

- [52] Samokhina E, Samokhin A. Neuropathological profile of the pentylenetetrazol (PTZ) kindling model. *Int J Neurosci* 2018;128:1086–96. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1481064>.
- [53] Dhir A. Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci* 2012;Chapter 9:Unit9.37. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0937s58>.
- [54] Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 2011;20:359–68. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.003>.
- [55] Wenker IC, Teran FA, Wengert ER, Wagley PK, Panchal PS, Blizzard EA, et al. Postictal Death Is Associated with Tonic Phase Apnea in a Mouse Model of Sudden Unexpected Death in Epilepsy. *Ann Neurol* 2021;89:1023–35. <https://doi.org/10.1002/ana.26053>.
- [56] da Silva GSF, Li A, Nattie E. High CO₂/H⁺ dialysis in the caudal ventrolateral medulla (Loeschcke's area) increases ventilation in wakefulness. *Respir Physiol Neurobiol* 2010;171:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.01.014>.
- [57] Leirão IP, Zoccal DB, Gargaglioni LH, da Silva GSF. Differential modulation of active expiration during hypercapnia by the medullary raphe in unanesthetized rats. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* 2020;472:1563–76. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02455-5>.
- [58] Leirão IP, Silva CA, Gargaglioni LH, da Silva GSF. Hypercapnia-induced active expiration increases in sleep and enhances ventilation in unanaesthetized rats. *J Physiol* 2018;596:3271–83. <https://doi.org/10.1113/JP274726>.
- [59] Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav* 2009;98:579–86. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.005>.
- [60] Velíšková J, Velíšek L. Behavioral Characterization and Scoring of Seizures in Rodents. In: Pitkänen A, Buckmaster PS, Galanopoulou AS, Moshé SL, editors. *Models Seizures Epilepsy*. 2 ed, Academic Press; 2017, p. 111–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804066-9.00009-2>.
- [61] Authier S, Arezzo J, Pouliot M, Accardi MV, Boulay E, Troncy E, et al. EEG: Characteristics of drug-induced seizures in rats, dogs and non-human primates. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2019;97:52–8. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.03.004>.
- [62] Van Erum J, Van Dam D, De Deyn PP. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy Behav* 2019;95:51–5. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.02.029>.
- [63] Pohl M, Mares P. Effects of flunarizine on Metrazol-induced seizures in developing rats. *Epilepsy Res* 1987;1:302–5. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(87\)90006-4](https://doi.org/10.1016/0920-1211(87)90006-4).
- [64] Velíšková J, Velíšek L, Mares P, Rokyta R. Ketamine suppresses both bicuculline- and picrotoxin-induced generalized tonic-clonic seizures during ontogenesis. *Pharmacol Biochem Behav* 1990;37:667–74. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90544-r](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90544-r).
- [65] Pinault D, Slézia A, Acsády L. Corticothalamic 5–9 Hz oscillations are more pro-epileptogenic than sleep spindles in rats. *J Physiol* 2006;574:209–27. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.108498>.
- [66] Klippel Zanona Q, Alves Marconi G, de Sá Couto Pereira N, Lazzarotto G, Ferreira Donatti AL, Cortes de Oliveira JA, et al. Absence-like Seizures, Cortical Oscillations Abnormalities and Decreased Anxiety-like Behavior in Wistar Audiogenic Rats with Cortical Microgyria. *Neuroscience* 2022;500:26–40. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.07.032>.
- [67] Bartlett D, Tenney SM. Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol* 1970;10:384–95. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(70\)90056-3](https://doi.org/10.1016/0034-5687(70)90056-3).
- [68] Mortola JP, Frappell PB. Measurements of air ventilation in small vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol* 2013;186:197–205. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.02.001>.

- [69] Kalinowsky LB. History of Convulsive Therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1986;462:1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb51233.x>.
- [70] Brink JJ, Cariglia N, Stein DG, Galipeau LA. Uptake of [14C] pentylenetetrazol by developing rat brain. *Brain Res* 1970;19:445–50. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90387-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90387-2).
- [71] Haberer LJ, Pollack GM. Central nervous system uptake kinetics of pentylenetetrazol in the developing rat. *Biopharm Drug Dispos* 1991;12:59–71. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510120107>.
- [72] Ramzan IM, Levy G. Kinetics of drug action in disease states. XIV. Effect of infusion rate on pentylenetetrazol concentrations in serum, brain and cerebrospinal fluid of rats at onset of convulsions. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;234:624–8.
- [73] Zienowicz M, Wisłowska A, Lehner M, Taracha E, Skórzewska A, Maciejak P, et al. The effect of fluoxetine in a model of chemically induced seizures—behavioral and immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 2005;373:226–31. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.10.009>.
- [74] Fallert M, Dinse HR, Böhmer G, Krämer G, Baumgarten RV. Effects of pentylenetetrazol on respiration and bulbar respiratory neurones and its interaction with K⁺ ions and citrate. *Neuropharmacology* 1978;17:799–805. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(78\)90067-9](https://doi.org/10.1016/0028-3908(78)90067-9).
- [75] Hirsh K, Wang SC. Selective Respiratory Stimulating Action of Doxapram Compared to Pentylenetetrazol. *J Pharmacol Exp Ther* 1974;189:1–11.
- [76] Blum AS. Respiratory physiology of seizures. *J Clin Neurophysiol Off Publ Am Electroencephalogr Soc* 2009;26:309–15. <https://doi.org/10.1097/WNP.0b013e3181b7f14d>.
- [77] Lacuey N, Zonjy B, Hampson JP, Rani MRS, Zaremba A, Sainju RK, et al. The incidence and significance of periictal apnea in epileptic seizures. *Epilepsia* 2018;59:573–82. <https://doi.org/10.1111/epi.14006>.
- [78] Dlouhy BJ, Gehlbach BK, Kreple CJ, Kawasaki H, Oya H, Buzza C, et al. Breathing Inhibited When Seizures Spread to the Amygdala and upon Amygdala Stimulation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2015;35:10281–9. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0888-15.2015>.
- [79] Nattie EE. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir Physiol* 2001;129:257–68. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00295-X](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00295-X).
- [80] André V, Pineau N, Motte JE, Marescaux C, Nehlig A. Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* 1998;10:2094–106. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00223.x>.
- [81] Pietrobon D, Moskowitz MA. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci* 2014;15:379–93. <https://doi.org/10.1038/nrn3770>.
- [82] Aiba I, Noebels JL. Spreading depolarization in the brainstem mediates sudden cardiorespiratory arrest in mouse SUDEP models. *Sci Transl Med* 2015;7:282ra46. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4050>.
- [83] Bernard C. Spreading depression: Epilepsy's wave of death. *Sci Transl Med* 2015;7:282fs14-282fs14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa9854>.



Respiratory activity during seizures induced by pentylenetetrazole

Hanna L. Umezu^a, Paloma G. Bittencourt-Silva^a, Flávio A.G. Mourão^{a,d}, Fabrício A. Moreira^b, Márcio Flávio D. Moraes^{a,d}, Victor R. Santos^c, Glauber S.F. da Silva^{a,*},¹

^a Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais (ICB/UFMG), Belo Horizonte, Brazil

^b Department of Pharmacology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais (ICB/UFMG), Belo Horizonte, Brazil

^c Department of Morphology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais (ICB/UFMG), Belo Horizonte, Brazil

^d Graduate Program in Neuroscience, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais (ICB/UFMG), Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Edited by M. DUTSCHMANN

Keywords:

Breathing control
Apnea
Epilepsy
PTZ
SUDEP
Diaphragm

ABSTRACT

This study investigated the respiratory activity in adult Wistar rats across different behavioral seizure severity induced by pentylenetetrazole (PTZ). Animals underwent surgery for electrodes implantation, allowing simultaneous EEG and diaphragm EMG (DIA_{EMG}) recordings and the respiratory frequency and DIA_{EMG} amplitude were measured. Seizures were acutely induced through PTZ injection and classified based on a pre-established score, with absence-like seizures (spike wave discharge (SWD) events on EEG) representing the lowest score. The respiratory activity was grouped into the different seizure severities. During absence-like and myoclonic jerk seizures, the breathing frequency decreased significantly (~50% decrease) compared to pre- and post-ictal periods. Pronounced changes occurred with more severe seizures (clonic and tonic) with periods of apnea, especially during tonic seizures. Apnea duration was significantly higher in tonic compared to clonic seizures. Notably, during PTZ-induced tonic seizures the apnea events were marked by tonic DIA_{EMG} contraction (tonic-phase apnea). In the majority of animals (5 out of 7) this was a fatal event in which the seizure-induced respiratory arrest preceded the asystole. In conclusion, we provide an assessment of the respiratory activity in the PTZ-induced acute seizures and showed that breathing dysfunction is more pronounced in seizures with higher severity.

1. Introduction

Epilepsy is a neurological disorder characterized by the occurrence of recurrent and spontaneous seizures. It is highly prevalent among the population and is a global health issue affecting about 65 million people worldwide (Devinsky et al., 2018; Fisher et al., 2014; Ngugi et al., 2010), and it is estimated to be higher in low and middle-income countries when compared to developed ones (Kevin Pacheco-Barrios et al., 2022; Ngugi et al., 2010; Singh and Trevick, 2016). Epileptic seizures are transient behavioral abnormalities comprising objective signs or symptoms, caused by abnormal excessive or synchronous neuronal activity in the brain (Devinsky et al., 2018). Although the cause of epilepsy in many patients is unknown, several injuries that affect the brain's function may lead to seizures, such as strokes or traumatic brain damage, infectious diseases, tumors, autoimmune diseases, and even genetic mutations (Devinsky et al., 2018). The first-line treatment for epilepsy consists of

the monotherapy of anti-seizure drugs to suppress seizure occurrence, although they may not be effective against the epileptogenic process itself. However, despite the efforts and advances in anti-seizure drug screening, approximately one-third of patients remain unresponsive to pharmacological treatment (Chen et al., 2018).

The most common cause of death among individuals with drug-refractory epilepsy is SUDEP, sudden unexpected death in epilepsy (Devinsky et al., 2018, 2016). The SUDEP is defined as "sudden, unexpected, witnessed or unwitnessed, non-traumatic and non-drowning death in patients with epilepsy, with or without evidence for seizure and excluding documented status epilepticus, in which postmortem examination does not reveal a toxicologic or anatomic cause of death" (Devinsky et al., 2018; Nashef et al., 1998). Evidence suggests that the occurrence of primary or secondary generalized tonic-clonic seizures is an important risk factor for SUDEP (Bozorgi and Lhatoo, 2013; Hedorffer et al., 2011; Nashef et al., 1998; Nilsson et al., 1999; Ryvlin et al.,

* Correspondence to: Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Campus UFMG Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

E-mail addresses: glauber@icb.ufmg.br, glaubersfs@ufmg.br (G.S.F. da Silva).

¹ ORCID: 0000-0002-6269-7443

<https://doi.org/10.1016/j.resp.2024.104229>

Received 25 November 2023; Received in revised form 27 January 2024; Accepted 29 January 2024

Available online 1 February 2024

1569-9048/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

2013; Shorvon and Tomson, 2011; Tomson et al., 2005). The pathophysiology of SUDEP has not been precisely determined and is most likely multifactorial, although evidence indicates that it is related to a seizure-induced respiratory failure (Buchanan et al., 2014; Dhaibar et al., 2019; Kim et al., 2018; Ryvlin et al., 2013; Shorvon and Tomson, 2011; Tomson et al., 2005). Accordingly, the respiratory alterations induced by seizures have been recognized for a long time (Jackson, 1899). Current evidence robustly demonstrates dysfunctional breathing patterns during seizure events (Bateman et al., 2008; Vilella et al., 2019). A large study investigating about 300 seizures in 56 epilepsy patients revealed a connection between the seriousness of oxygen desaturation and different factors such as the duration, type, and origin of the seizures. Additionally, end-tidal carbon dioxide (ETCO₂) increased during seizures caused by hypoventilation (Bateman et al., 2008).

Animal models have been used to better understand the pathophysiological mechanisms of breathing control during convulsive seizures and epilepsy (Goldman et al., 2017; Löscher, 2017). In this context, seizure-induced respiratory arrest has been described in DBA/1 mice susceptible to audiogenic seizures (Faingold et al., 2010), which could be attenuated after electrolytic lesions of the amygdaloid complex (Marincovich et al., 2021). Other genetically modified mice have also been used to uncover relevant aspects of respiratory arrest during ictal events (Goldman et al., 2017). Importantly, among the experimental models, pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures have been extensively and reliably used for antiepileptic drug testing (Bialer and White, 2010; Borowicz and Banach, 2014; Goldman et al., 2017; Löscher, 2017; Uttl et al., 2021). It stimulates epileptogenic activity by blocking GABA_A receptors and, consequently, impairing GABA-mediated inhibitory transmission (Samokhina and Samokhin, 2018; Velisek et al., 1992).

Previous evidence in mice, both the *Scn8a* mutant mice and PTZ-injected mice, showed the occurrence of convulsive seizure-induced death in parallel with apnea event during the tonic phase, presenting a quite similar respiratory impairment shown in a case report of an 18-month-old male patient with SCN8A mutation (Wenker et al., 2021). While this evidence suggests that PTZ-induced seizure death involves respiratory arrest in mice, as far as we know, there is no report in the literature that systematically assessed PTZ-induced seizures in rats and hence its potential as a model to study breathing activity during ictal events. Thus, in the present study, we have administered different doses of PTZ to chemically induce acute seizures in adult rats and tested the hypothesis that the magnitude of the respiratory dysfunctional activity varies according to seizure severity. We also evaluated whether the respiratory arrest is elicited concomitant with tonic seizure events.

2. Material and methods

2.1. Ethical approval and animals

Adult (220–240 g) male Wistar rats were obtained from the animal facility of the Institute of Biological Sciences (CEBIO/ICB) at the Federal University of Minas Gerais (UFMG) and kept in the facility of the Department of Physiology and Biophysics (BIC-BIO-2). Animals were housed under a 12-hour light-dark cycle with water and food *ad libitum*. All procedures were conducted during the light period (between 8 am and 5 pm) at room temperature (23–25 °C). A total of twenty-five adult rats were used in the present study. Animal handling and experimental protocols were carried out following the guidelines of the Brazilian Council for Animal Experimentation (CONCEA) and approved by the Institutional Committee of Animal Care and Use at UFMG (CEUA n° 279/2022).

2.2. Surgical procedures

For cortical electroencephalogram (EEG) and diaphragm electromyogram (DIA_{EMG}), electrodes were surgically implanted. Electrodes for

the EEG were sourced from commercial-grade screws (Plastics One Inc, Roanoke, VA, USA) and EMG electrodes were customized, using a multi-strand coated stainless steel wire (A-M Systems, Sequim, WA, USA). Initially, the animals were anesthetized with isoflurane by a precision vaporizer infusion pump (Bonther, Ribeirão Preto, SP, Brazil) at concentrations of 5% for induction and 1.5 to 2.0% for maintenance. The surgical procedures to implant EEG and EMG electrodes have been previously described (da Silva et al., 2010; Leirão et al., 2020, 2018). Briefly, after the absence of reflexes and signs of no pain, the top of the head was trichotomized and sterilized with chlorhexidine 2%, and an incision on the midline was made. Next, the animals were placed in the supine position, and, after local asepsis, a diagonal incision was made under the last rib on the right side, allowing access to the diaphragm. A pair of electrodes was tunneled under the skin (from the incision on the top of the head to the incision under the ribcage), and the electrodes were implanted in the diaphragm muscle (DIA_{EMG}). For EEG implantation, the animals were placed in a stereotaxic apparatus (Kopf, USA) and three electrodes were screwed (da Silva et al., 2010) in the skull as follows: *i* - signal electrode: 2 mm anterior to the bregma and 2 mm lateral to the midline (right side); *ii* - reference electrode: 4 mm anterior to the lambda and 2 mm lateral to the midline (right side); *iii* - ground electrode: between the frontal and parietal electrodes on the left. Finally, the electrodes were positioned on a 6-channel socket (plastic socket, Plastics One Inc, Roanoke, VA, USA) which was fixed to the skull with dental acrylic. After the surgery, animals received analgesic (flunixin meglumine 2.5 mg/kg; subcutaneous, s.c.) and antibiotic (Pentabiotico, Fontoura-Wyeth, SP, Brazil, 80.000 UI; intramuscular, i.m.) drugs and were allowed to recover for five to seven days.

2.3. EEG and EMG recordings

An insulated cable was attached to the socket on the animal's head, then connected to an electrical swivel (commutator) in the internal surface of the lid of a cylindrical plethysmography acrylic chamber (5 L; 18.5 cm diameter and 18 cm height; Bonther, Ribeirão Preto, SP, Brazil), which allowed the animal to freely move. Signals were amplified x1000 (A-M Systems, Sequim, WA, USA, model 1700) and band-pass filtered (low and high cut-off: 0.1 and 500 Hz for the EEG, and 0.1 and 1 kHz for EMG). Signal acquisition was sampled at 2 kHz by PowerLab system (ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) with LabChart7 software.

2.4. Experimental protocol

To induce acute seizures with a wide range of different severity scores, pentylenetetrazol (PTZ; Sigma-Aldrich) was used at four different doses (30, 60, 75, and 90 mg/kg) (Löscher, 2011). Each dose was specifically used in an experimental group allowing us to better explore the relationship between seizure severity and respiratory activity. Adult male rats were grouped in different PTZ doses as follow; 30 mg/kg (n = 6), 60 mg/kg (n = 6), 75 mg/kg (n = 7) and 90 mg/kg (n = 6). Immediately before the experiments, the drug was freshly dissolved in 0.9% sterile saline. The experimental protocol was performed from five to seven days after the surgery, as follows: animals were placed in the plethysmography chamber (unanesthetized and freely moving), connected to the signal acquisition system, and allowed to acclimate for at least 30 min before starting the experiment. During the procedure, the chamber was ventilated with room air (2000 mL·min⁻¹). After the acclimatization period, a 30-minute EEG and EMG baseline recording was made. Finally, the PTZ was injected intraperitoneally (i.p.) at a volume of 1 mL/kg and then a one-hour recording was performed. During the entire protocol, to correctly identify the behavior in each seizure event, every step of the experiment was video-recorded (Logitech, c270 HD 720p 30fps) by the acquisition system and synchronized with the EEG/EMG.

2.5. Data analyses and statistics

Seizures induced by PTZ have been well described and classified elsewhere (Authier et al., 2019; Lüttjohann et al., 2009; Van Erum et al., 2019; Velísková and Velíšek, 2017). In all the experiments, the EEG analysis was carried out simultaneously with the video analysis. The severity of behavioral seizures was classified according to the previous description (Lüttjohann et al., 2009; Pohl and Mares, 1987; Velísková et al., 1990; Velísková and Velíšek, 2017). PTZ seizures were scored using a modified seizure scale (Lüttjohann et al., 2009; Velísková and Velíšek, 2017) from zero to five, as follows: 0) no changes in behavior; 0.5) abnormal behavior or behavioral arrest; 1) single myoclonic jerks; 2) unilateral or incomplete clonic seizure; 3) fully developed bilateral forelimb clonus; 3.5) forelimb clonus with a tonic component and twist of body; 4) clonus of all limbs; 5) fully developed tonic-clonic seizure. The score 0.5 was associated with a behavioral arrest during the awake state and it was classified as absence-like seizure, characterized by EEG events of spike wave discharge (SWD) (Klippel Zanona et al., 2022; Pinault et al., 2006). For this analysis, EEG associated with the behavior arrest during the awake state was visually inspected offline and only events that lasted more than 2 s were analyzed, due to the necessity of correlation with the behavior arrest. Two variables were assessed from the behavior analysis according to the doses of PTZ used: the most severe seizure (highest seizure score) and the latency (in seconds) until the first behavioral seizure (the first myoclonic jerk).

The respiratory activity was assessed directly from the DIA_{EMG}, which had the raw signal integrated and the amplitude of the DIA_{EMG} was calculated (the integral channel calculation of the Labchart7 software was used, with positive only data points and a time constant of 50 ms). The same analysis criteria were applied to all animals: *i*- baseline period (i.e., before PTZ injection) was considered during quiet wakefulness periods; *ii*- after PTZ injection (prior to seizure's onset) was considered as 30 s after PTZ injection. Since PTZ itself increased exploratory behavior and respiratory activity, this period was used to normalize the analyses related to the ictal moments (i.e., after the PTZ injection but before the development of ictal brain activity); *iii*- pre-ictal events were analyzed right before the onset of the seizure event. The respiratory frequency was quantified in breaths/min, and the integrated DIA_{EMG} was in arbitrary units. Subsequently, the responses of these variables to seizures were presented as normalized values (normalized to the period after PTZ injection but before ictal activity). The analysis of respiratory activity (DIA_{EMG}; breathing frequency and Peak Amp) was made according to the type of seizure (absence-like seizure, myoclonic jerks, clonic and tonic-clonic). Three periods related to absence-like events were analyzed: the pre-ictal, ictal (during the seizure), and the post-ictal. Regarding myoclonic jerk events, two moments were analyzed: immediately before and after the event (pre- and post-ictal). For this type of behavior, the analysis was performed excluding the ictal period due to the suddenness of this type of seizure, with short abrupt body movements and large movement artifacts, which hindered the precise EMG analysis. Moreover, on several occasions, myoclonic jerk events were immediately followed by other seizures, and this impaired the post-ictal period analysis of some events. Clonic seizures often occurred after a period of fast and consecutive myoclonic jerks. For this reason, the respiratory activity was only analyzed during the ictal and the post-ictal period. Regarding tonic-clonic events, two tonic contractions of the diaphragm were always observed, and only the one with the highest Peak Amp was analyzed. Due to the tonic contraction (tonic-phase apnea), the Rf of this type of seizure could not be evaluated. During both clonic and tonic-clonic seizures, several events of apnea were identified, and their duration was quantified. Apneas were defined as a respiratory arrest that lasted for more than two breathing cycles. The electrocardiogram appeared in the DIA_{EMG} only as very weak 'noise' and hence, the heart activity could be observed only during the prolonged fatal apneas when the animal experienced respiratory arrest.

The data were expressed graphically showing each animal. Group

data were expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA was used for the comparison of the effects of different doses on the latency to the first seizure (expressed in seconds). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons post-hoc test was applied on the highest seizure score. Additionally, for each seizure type, the respiratory variables (Rf and DIA_{EMG} Peak Amp) were compared during seizures accordingly (i.e., pre-ictal, ictal, and post-ictal) using One-way ANOVA. Tukey's *post hoc* multiple comparison test was used. The comparison of apnea duration between clonic and tonic-clonic seizure events was evaluated using Student *t* test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Effect of different PTZ doses on the seizure score and latency time

The baseline breathing recording prior to PTZ injection demonstrated that the baseline Rf averaged 103.2 ± 3.6 breaths/min and the DIA_{EMG} Peak Amp remained constant, as expected for awake adult rats. Different PTZ doses triggered different behavioral seizure scores (Fig. 1A). Notably, there was a clear dose-response relationship, with higher doses resulting in more severe seizures (75 vs 30 mg/kg, $p = 0.032$; 90 vs 30 mg/kg, $p = 0.0091$). In animals that received the lowest PTZ dose (30 mg/kg; $n = 6$), we observed responses characterized predominantly by absence-like events. In contrast, the group of animals that received the dose of 60 mg/kg ($n = 6$) exhibited a spectrum of responses, with the lowest manifestation being isolated myoclonic jerks, and the most severe (highest score) being tonic-clonic seizures. For the dose of 75 mg/kg ($n = 7$), only two animals presented absence-like events without progression to more severe seizures, while two others presented clonic seizures, and three animals demonstrated the highest severity scores. Similarly, the 90 mg/kg PTZ dose group ($n = 6$) displayed variable response, the lowest response being an unilateral clonic seizure, and the most severe being a tonic-clonic event. Regarding the latency for the first seizure event, the animals in the 60 mg/kg PTZ dose group exhibited a significantly longer time (124.5 ± 16.24 s, $p < 0.005$) before the onset of the first behavioral seizure (myoclonic jerks), as compared to the other groups. The doses of 75 mg/kg and 90 mg/kg took $53.6 (\pm 6.36)$ s and $63 (\pm 5.3)$ s, respectively, notably shorter latency periods. (Fig. 1B).

3.2. Absence-like seizures decrease respiratory activity

Fig. 2A and B demonstrate a visual representation of EEG and DIA_{EMG} recordings from two representative animals, depicting a transitory mild (Fig. 2A) and a pronounced (Fig. 2B) attenuation in respiratory activity during absence-like events. The group data show that during the seizure event (ictal), the DIA_{EMG} Peak Amp showed a significant decrease (0.8769 ± 0.03 ; $p < 0.05$) and a post-ictal recovery was observed, compared to the period after injection (Fig. 2C). During the ictal period, similarly to the amplitude, the respiratory frequency (Rf) presented a clear decrease compared to the after-injection period (and before seizure) (0.4791 ± 0.06 ; $p < 0.0001$). Immediately after the seizure's cessation (post-ictal), the Rf returned to values similar to those seen after the PTZ injection and to those right before the onset of the event (Fig. 2D). These group data indicate that PTZ-induced absence-like seizures are accompanied by a significant attenuation in respiratory activity.

3.3. Myoclonic jerk events and the respiratory activity

The respiratory activity analyzed during myoclonic jerk events is detailed in Fig. 3. As depicted, the pre-ictal phase displayed a slight increase in the DIA_{EMG} Peak Amp (1.179 ± 0.06 ; $p > 0.05$) and an increase in the Rf (1.224 ± 0.13 ; $p > 0.5$). However, it's noteworthy that these changes were not statistically significant when compared to the period immediately following PTZ injection (Fig. 3A and B). Following

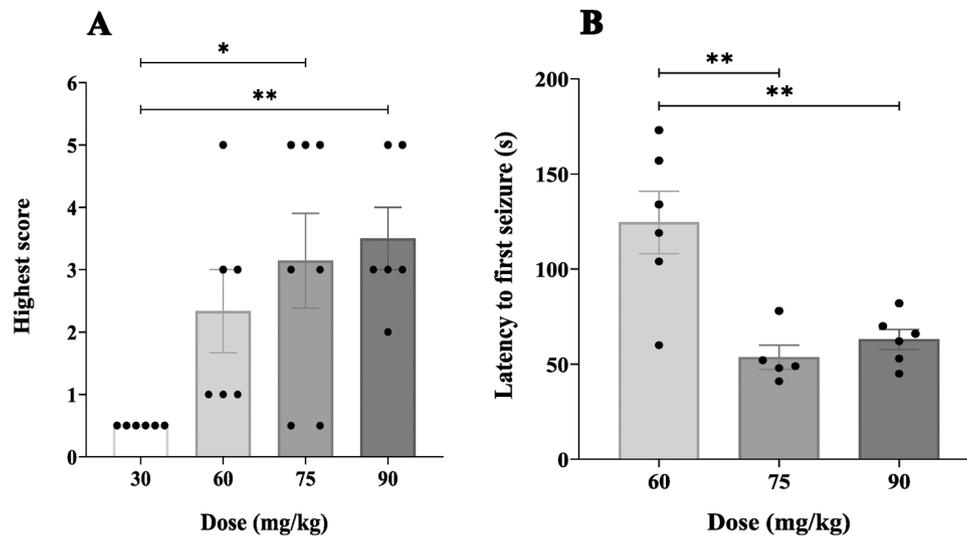


Fig. 1. Effect of different PTZ doses on the seizure and on the latency. A) Highest score (most severe) elicited by each dose. B) Latency (s) to the first behavioral seizure (myoclonic jerks) for each PTZ dose. The animals that received the dose of 60 mg/kg took significantly longer to develop the first seizure than the animals that received the other doses. The 30 mg/kg dose is not shown due to its lack of behavior, *i.e.*, it elicited only absence-like seizures characterized by the SWD. Each dot represents one animal and data are expressed as mean \pm SEM. *Indicates significant difference between the latency for the 60 mg/kg compared to the 75 and 90 mg/kg doses (** $p < 0.005$) determined by one-way ANOVA and Tukey test analysis.

the myoclonic jerk event, a notable shift in the DIA_{EMG} Peak Amp increased (1.471 ± 0.187 ; $p = 0.0005$) and the Rf decreased (0.5375 ± 0.11 ; $p < 0.0001$) significantly (Fig. 3B and C).

3.4. Clonic seizures increase the DIA_{EMG} Peak Amp and decrease the Rf

Fig. 4 illustrates the respiratory activity during clonic seizure events. In Fig. 4A, an EEG and EMG recording from a representative animal displays myoclonic jerks followed by a clonic seizure event. Notably, there is a distinct period of apnea (referred to as ictal apnea) followed by a recovery of breathing activity during the clonic event. The DIA_{EMG} Peak Amp increased significantly both during (1.755 ± 0.11 ; $p = 0.0005$) and after (1.712 ± 0.16 ; $p = 0.0005$) the clonic event compared to the period after PTZ injection (Fig. 4B). Interestingly, following the ictal apnea, there is a marked decrease in Rf both during the ictal and in the post-ictal phase (0.6418 ± 0.04 and 0.5843 ± 0.05 , respectively; $p < 0.0001$) (Fig. 4C). It is important to mention that, unlike absence-like seizures and myoclonic jerks, the group data consistently demonstrate the presence of apnea events during clonic seizure events (as depicted in the Fig. 4A and C).

3.5. Tonic-clonic seizures and apnea events

During the tonic-clonic seizure, we consistently observed tonic contraction of the diaphragm, as demonstrated in Fig. 5A and B, the DIA_{EMG} Peak Amp increased significantly (12.03 ± 1.7 ; $p < 0.0001$) when compared to the post-PTZ injection phase (Fig. 5A and B). However, it is essential to note that a significant proportion of the animals (five out of seven) experiencing tonic-clonic seizure died due to respiratory arrest following the conclusion of the ictal period. In those cases, this was often marked by severe apnea followed by respiratory arrest preceding final asystole (Fig. 5A₁). In contrast, the two animals that survived these seizures exhibited consecutive myoclonic jerks after the tonic event, and notably, their respiratory activity resumed shortly thereafter the tonic event (Fig. 6). When comparing fatal and non-fatal events, we did not observe differences in the duration of apneas nor the amplitude of the DIA tonic contraction. The duration of the apnea of fatal events was 28.01 ± 2.67 s ($n = 5$), whereas the duration of the apnea of non-fatal events was 24.9 ± 8.25 s ($n = 2$). The DIA_{EMG} Peak Amp of the tonic-clonic events that resulted in death was 11.5 ± 2.05 ,

and those animals that did not die presented a DIA_{EMG} Peak Amp of 11.25 ± 2.92 . Comparing tonic-clonic events and clonic seizures, in terms of the duration of the apnea, it is noteworthy that during tonic-clonic seizures, animals experienced long-lasting severe apneas lasting approximately 27.12 ± 2.64 s, which is significantly ($p < 0.0001$) longer compared to apneas observed in the clonic seizure events. During clonic seizures, apneas were approximately six times shorter, with a duration of 4.569 ± 0.46 s compared to tonic-clonic events, as illustrated in Fig. 5C.

4. Discussion

In the present study, we have used PTZ-induced acute seizure in adult rats to investigate respiratory activity across different severities of seizure events. Overall, our findings indicate that as seizure severity increases, breathing dysfunction becomes more pronounced. Specifically, we observed mild breathing attenuation during low-severity seizures such as absence-like seizures and myoclonic jerks. Notably, during absence-like seizures a marked decrease in breathing frequency was observed. Whereas, the most severe seizures promoted ictal apneas (in clonic seizures) and suppression of respiratory activity, characterized by long-lasting apnea during tonic-clonic seizures. To our knowledge, our study is the first dataset to systematically characterize respiratory activity in PZT-induced acute seizures, encompassing various behavioral manifestations of seizure severities.

PTZ was first used in 1934 (cited in Kalinowsky, 1986) as a convulsant agent and it has been consistently used in the seizure research field for decades. The pharmacokinetic profile of PTZ includes high bioavailability, rapid distribution to organs, brief latency of action, blood-brain barrier permeability with rapid brain uptake, and the capability to stimulate epileptogenic activity by inhibiting GABA-mediated transmission (Brink et al., 1970; Haberer and Pollack, 1991; Ramzan and Levy, 1985; Samokhina and Samokhin, 2018; Zienowicz et al., 2005). It has been reported that (for a PTZ bolus dose of 20 mg/kg, *i.v.*) the PTZ concentrations in the brain and serum were similar to those in cerebrospinal fluid and that their concentrations were not affected by drug infusion rate, and the terminal half-life averaged 116 min (Ramzan and Levy, 1985). For *i.p.* injection of a convulsant dose (clonus onset), brain PTZ uptake was rapid (averaging 4 min) following injection (Yonekawa et al., 1980). PTZ is a model of

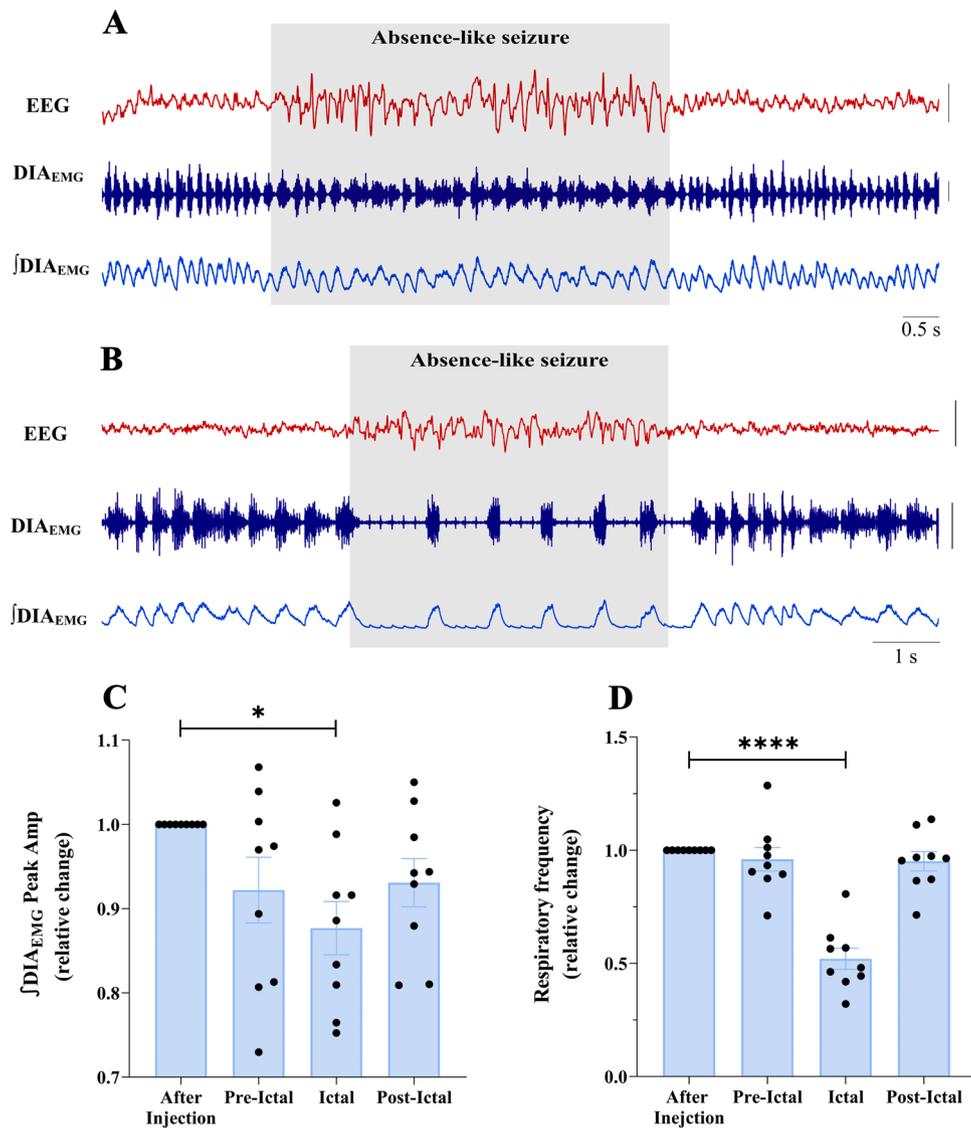


Fig. 2. Absence-like seizures decrease the respiratory frequency. **A)** Representative traces of the EEG, DIA_{EMG} and integrated ∫DIA_{EMG} (from top to bottom) of one animal with mild Rf decrease. The gray area depicts the time window for absence-like seizure (SWD). Scale bars of the EEG and DIA_{EMG}: 0.4 mV and 0.5 mV, respectively. **B)** Representative traces of the EEG, DIA_{EMG} and ∫DIA_{EMG} of another different animal that presented a marked decrease in Rf. Scale bars of the EEG and DIA_{EMG}: 0.5 mV and 0.2 mV, respectively. **C)** Group data for the DIA_{EMG} Peak Amp relative change 30 s after the PTZ injection, immediately before the seizure (pre-ictal), during the absence-like event (ictal), and immediately after it (post-ictal). **D)** Group data for the Rf relative change 30 s after the PTZ injection, during the pre-ictal, ictal, and post-ictal moments. During the ictal event, the Rf decreases significantly compared to the post-injection period. Each dot represents one animal and data are expressed as mean (± SEM). *Indicates significant difference between the moments after injection and during SWD (*p < 0.05; ****p < 0.0001).

generalized seizures with multifocal onset and evokes both forebrain (clonic) and hindbrain (tonic) activity similar to that seen in human secondarily generalized seizures (Bialer and White, 2010; Löscher, 2011). PTZ-induced seizures are well documented in the literature, easy to replicate, and commonly used for screening anticonvulsant drugs (Bialer and White, 2010; Löscher, 2017). Additionally, the advantage of this experimental model lies in the convenience of its systemic application (i.p. or s.c. administration), eliminating the need for surgery for a complex preparation, and it consistently elicits seizures within a relatively short time interval.

Importantly, our study revealed that PTZ-induced acute seizures replicate respiratory events resembling those observed in SUDEP cases in which respiratory arrest and terminal apnea preceded the asystole (Ryvlin et al., 2013). Nonetheless, the use of the PTZ model in this context is not without caveats. The widespread circulation of PTZ and its potential to interfere with brainstem neuronal circuits involved in breathing control, through the inhibition of GABA neurotransmission,

may represent a potential downside. There is evidence showing that PTZ exerts stimulant effects on breathing (Fallert et al., 1978; Hirsh and Wang, 1974). Specifically, the activity of most recorded respiratory neurons was enhanced by focal medullary application of PTZ in anesthetized rabbits (Fallert et al., 1978). Hence, in the present study, the effects of PTZ on respiratory changes remain possible and the magnitude of this effect is challenging to predict. However, our results demonstrate that during absence-like, clonic, and tonic seizures, the respiratory activity varied rapidly (including periods of decreased or apneas) and was closely linked to the EEG seizure events. This suggests that the respiratory control system remains responsive to the interference caused by ictal brain activity. Additionally, considering that ventilation is the first convective step moving air in and out of the lungs, and hence providing the necessary O₂ to the organism (and CO₂ removal), the lack of information on pulmonary ventilation, in the present study, makes it difficult to estimate changes in blood gases, particularly during seizures in which Rf decreased but the DIA_{EMG} amplitude increased. The DIA_{EMG} may

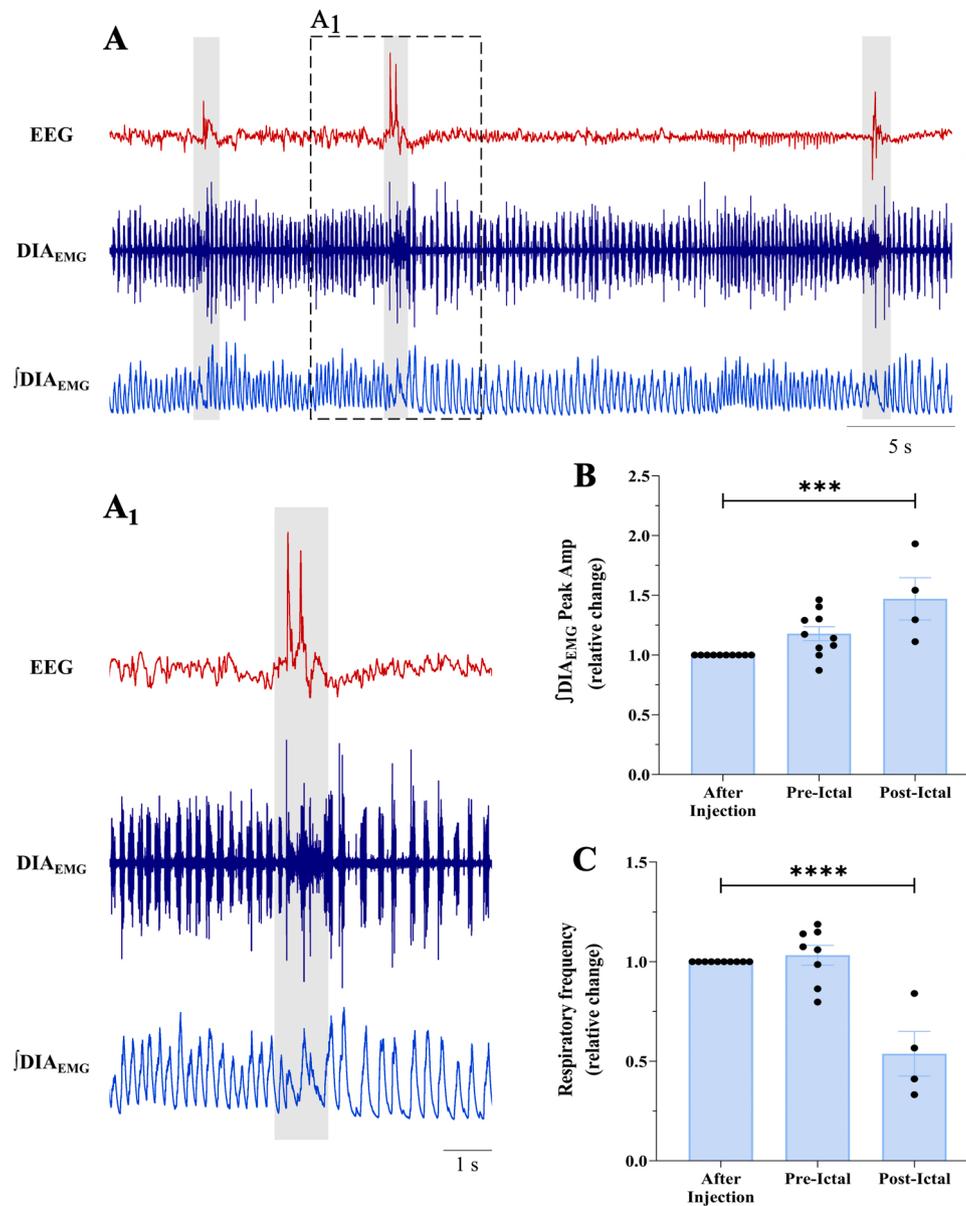


Fig. 3. Myoclonic jerks and the respiratory activity. A) Representative traces of the EEG, DIA_{EMG} and integrated ∫DIA_{EMG} (from top to bottom) of one animal. The gray areas indicate different myoclonic jerk events. Scale bars of the EEG and DIA_{EMG}: 0.5 mV and 0.2 mV, respectively. A₁) Expanded traces of the EEG, DIA_{EMG} and ∫DIA_{EMG} showed in the rectangle B) and C) show the group data for DIA_{EMG} Peak Amp and R_f, respectively, for the relative changes 30 s after PTZ injection, immediately before the seizure (pre-ictal), and immediately after the event (post-ictal). Each dot represents one animal and data are expressed as mean (± SEM). *Indicates significant difference between the moments after the injection and after myoclonic jerk events (**p = 0.0005; ****p < 0.0001) determined by one-way ANOVA and Dunnett test analysis.

represent an indication of relative changes in tidal volume, but not changes in absolute tidal volume values (mL).

Currently, there is a limited number of studies that directly measured the diaphragm activity during seizures (Wenker et al., 2021), while many others evaluated the ictal respiratory activity through different methods such as whole-body plethysmography, pneumotachograph, blood oxygen saturation, ETCO₂, inductance plethysmography or video analysis (Bateman et al., 2008; Blum, 2009; Buchanan et al., 2014; Dhaibar et al., 2019; Kim et al., 2018; Lacuey et al., 2018; Ryvlin et al., 2013; Sainju et al., 2019). Our methodology allowed us to measure the major inspiratory muscle, which represents the direct inspiratory motor output, and this has two important considerations: *i*- Our results reveal that apnea events during tonic seizures (tonic apnea) are a consequence of the sustained contraction of the major inspiratory muscle, the diaphragm. This tonic muscle activity disrupts the regular rhythmic

contractions required for effective thoracic movements and ultimately, alveolar ventilation. While conceptually simple, direct inspiratory muscle measurements (EMG recordings) during seizures are poorly reported for both humans and rodents. Herein, our observations of the tonic-phase apnea in adult rats are in agreement with similar findings in mice (Wenker et al., 2021). And, *ii*- Apnea events during clonic seizures might have been missed, due to the intense movement artifacts, if respiratory activity were measured by the plethysmography method. Therefore, the DIA_{EMG} revealed that apnea events are present in both clonic and tonic seizure events. However, the apneas during clonic events did not present tonic diaphragmatic contraction, suggesting distinct mechanisms underlying apnea occurrence in clonic compared to tonic seizure events. Suggestively, one could hypothesize that mechanisms of central apnea (failure of the central respiratory network to generate a proper motor output, rather than obstructive apnea) are

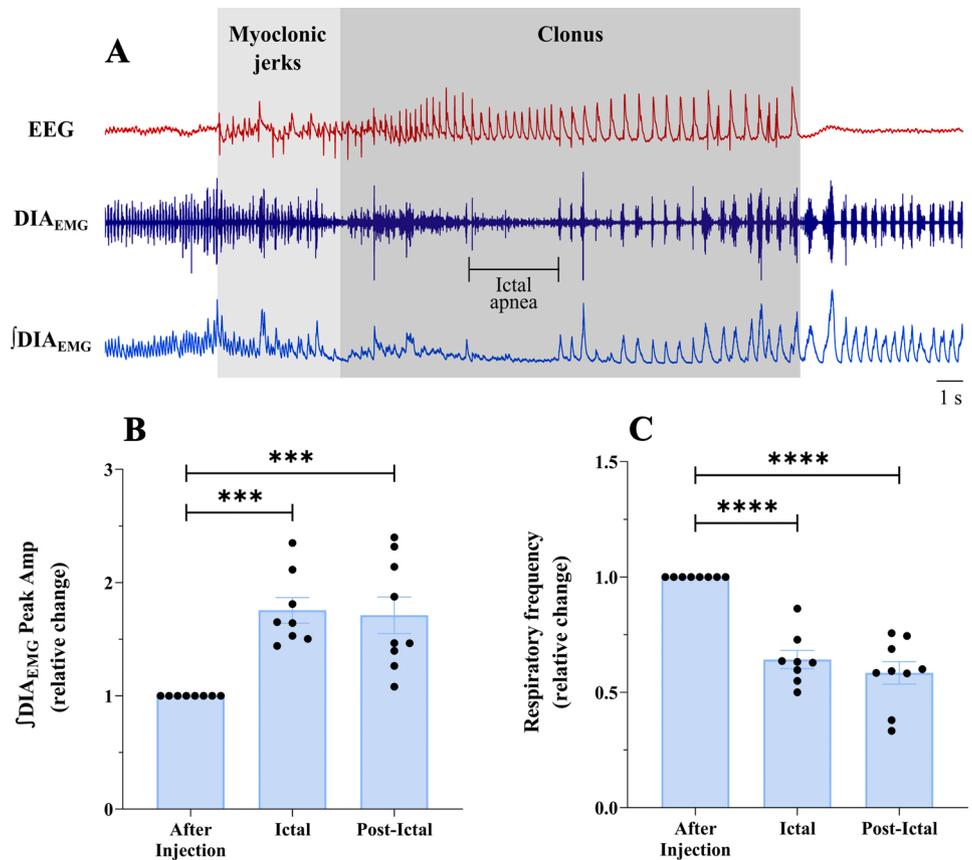


Fig. 4. Clonic seizures increase the DIA_{EMG} Peak Amp and decrease the Rf. A) Representative traces of the EEG, DIA_{EMG} and integrated ∫DIA_{EMG} (from top to bottom) of one animal. Light gray area and dark gray area encompass consecutive myoclonic jerk events and clonic seizure, respectively. Note the ictal apnea during the clonic seizure. B) and C) group data for DIA_{EMG} Peak Amp and Rf, respectively, showing the relative change 30 s after PTZ injection, during the clonic event (ictal), and immediately after it (post-ictal). Each dot represents one animal and data are expressed as mean (± SEM). *Indicates significant difference between the moments after the injection, during and after clonic seizures (***p = 0.0005; ****p < 0.0001).

associated with clonic events. Despite existing evidence in humans indicating the inhibitory role of the amygdala in breathing activity in seizures (Dlouhy et al., 2015), the brainstem mechanisms of central apneas in PTZ-induced clonic seizures remain unknown and to be explored in both rats and mice.

The brainstem respiratory network operates in a highly interconnected manner, interacting with other elements like the limbic system, neocortex, and hypothalamus to respond to diverse metabolic, behavioral, and environmental changes that can influence breathing (such as sleep, exercise, emotions, and locomotion) (Del Negro et al., 2018; Feldman et al., 2003; Nattie, 2001). However, our present study has limitations in elucidating the exact mechanisms of seizure-induced respiratory arrest or how PTZ-induced seizure affects the brainstem respiratory network. Previous neuroanatomical evidence showed that low subconvulsive doses of PTZ result in c-Fos labeling primarily in the hypothalamus and thalamus. However, as doses increased, triggering clonic seizures, c-Fos also appeared in the hippocampus, striatum, and brainstem (including the NTS) (André et al., 1998). This evidence indicates that seizure severity is related to medullary brainstem activation, and is suggestive that seizure-induced respiratory failure in the PTZ model may involve a direct recruitment of brainstem respiratory-related regions. Moreover, two general potential mechanisms, non-synaptic and synaptic, have been discussed in the literature as contributors to respiratory failure associated with an ictal event. The non-synaptic mechanism is related to the so-called spreading depolarization (SD), which is a self-regenerating wave of depolarization in neurons associated with increased levels of extracellular potassium and glutamate (Aiba and Noebels, 2015; Pietrobon and Moskowitz, 2014). During SD, the

membrane is depolarized in a manner that prevents the generation of action potentials, leading to EEG suppression and deactivation of the neuronal network (Aiba and Noebels, 2015; Bernard, 2015). Studies in *Kcna1* and *Scn1a* mutant mice, have shown that chemically induced seizures cause an SD wave in the dorsal medulla, accompanied by EEG flattening, apnea, bradycardia, and asystole (Aiba and Noebels, 2015). On the other hand, synaptic mechanisms may contribute to respiratory suppression (or apnea) during seizures, in which synaptic activation of inhibitory (sub)cortical projections to brainstem respiratory centers could play a vital role (Dlouhy et al., 2015). In this context, consistent evidence suggests that when seizures spread to the amygdala, central apnea occurs. Electrical stimulation of this region also induces apnea (Dlouhy et al., 2015). In addition, electrolytic lesions of the amygdala in DBA/1 mice significantly reduced the incidence of seizure-induced respiratory arrest, indicating the crucial role of this region in compromising respiratory activity during seizures (Marincovich et al., 2021).

In a pivotal study, Ryvlin and cols. conducted recordings in an Epilepsy Monitoring Unit Study (MORTEMUS) revealing that all documented cases of SUDEP exhibited terminal respiratory arrest preceding terminal asystole (Ryvlin et al., 2013). Moreover, Wenker and cols. demonstrated that in *Scn8a* mutant mice, the primary cause of death was apnea, initiated during the seizure and continued for minutes until terminal asystole (Wenker et al., 2021). Similarly, Buchanan et al. (2014) showed that in a maximal electro-shock (MES) model that breathing cessation during seizures preceded terminal asystole, occurring after the terminal apnea (Buchanan et al., 2014). Collectively, this evidence strengthens the hypothesis that respiratory arrest is a fundamental event in pathophysiology of SUDEP. In this scenario, the use of

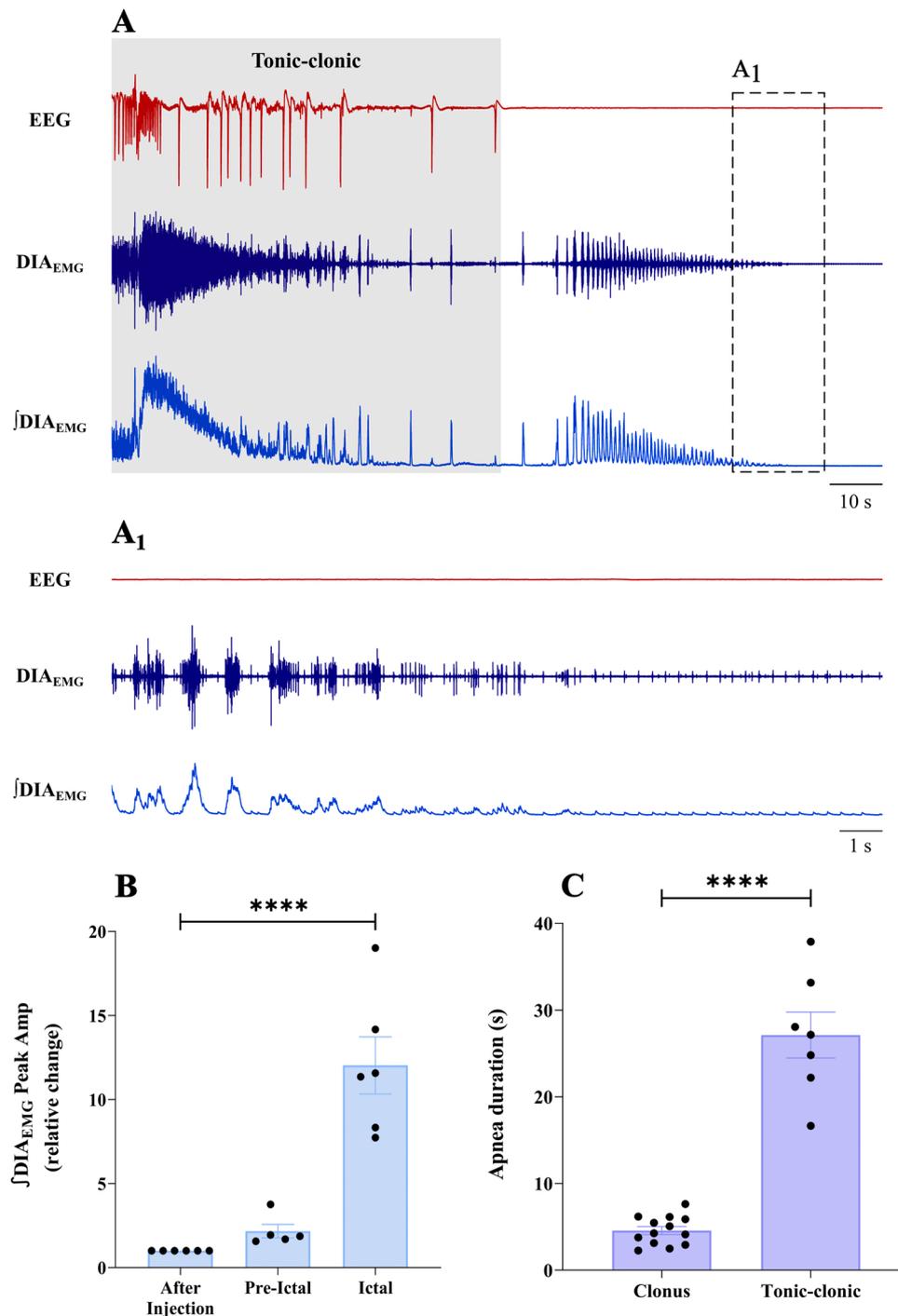


Fig. 5. Tonic-clonic seizures and apnea events. A) Representative traces of one animal showing the EEG, DIA_{EMG} and integrated ∫DIA_{EMG} (from top to bottom) of a fatal event. A₁) Expanded traces from panel A showing the terminal apnea occurring before the terminal asystole. As the DIA_{EMG} decreased and ceased, an ECG signal is captured by the EMG electrodes and appears as small signal (vertical lines) in the EMG recording. B) Group data for the ∫DIA_{EMG} Peak Amp relative change 30 s after PTZ injection, immediately before the seizure (pre-ictal), and during the tonic-clonic event (ictal). C) Group data showing the comparison of the duration of the ictal apnea during clonic and tonic-clonic seizures. *Indicates significant difference (*****p* < 0.0001). The difference between the duration of the apneas was calculated using an unpaired *t*-test (*****p* < 0.0001).

animal models has been essential to advance the understanding of breathing activity, epilepsy, and SUDEP. The present study, although not an epilepsy model *per se*, employs PTZ-induced acute seizures, reproducing pertinent characteristics of epileptic seizures. This model follows a well-described sequence of events culminating with generalized tonic-clonic seizures. Notably, PTZ-induced acute seizures recapitulate events related to SUDEP cases, where respiratory arrest with long-lasting apnea precedes asystole, establishing it as the primary

cause of death. Therefore, the PTZ model offers a convenient platform for studying ictal respiratory activity, facilitating further exploration of the mechanisms involved in ictal respiratory alterations.

5. Conclusions

In summary, our study uncovered that PTZ-induced acute seizure in adult rats exhibited an intensification of respiratory dysfunction with

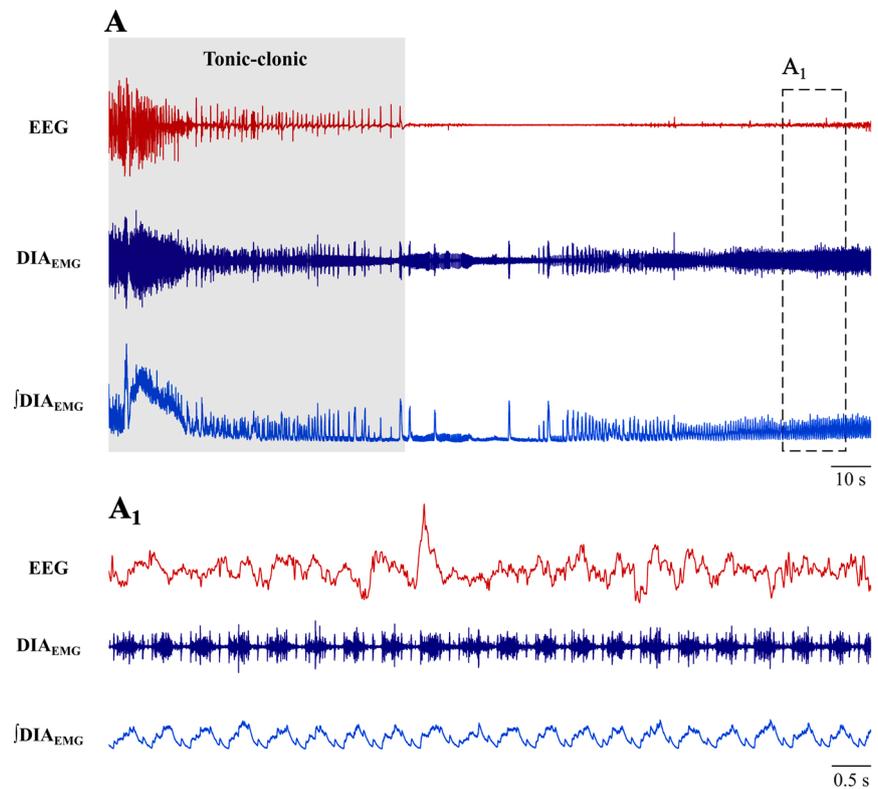


Fig. 6. Non-fatal tonic-clonic event. A) Representative traces of one animal showing the EEG, DIA_{EMG} and integrated $\int DIA_{EMG}$ of a non-fatal event. A₁) Expanded traces showing the full recovery of the respiratory activity.

increasing seizure severity. Low-severity seizures, including absence-like and myoclonic seizures, showed mild breathing disruptions, especially with a notable decrease in breathing frequency during absence-like seizures. Conversely, the most severe seizures, such as clonic and tonic-clonic seizures, induced ictal apneas and complete suppression of respiratory activity, including prolonged tonic-phase apneas. Importantly, the seizure-induced respiratory arrest preceded asystole in cases of fatal tonic seizures. These findings contribute to a better understanding of the respiratory activity during different seizures severity induced by PTZ. These data significantly impact and advance the characterization of rhythmic respiratory-related behavior in an animal model of acute seizure that is essential to advance our current knowledge on breathing control during seizures.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-00779-21) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; PQ2-311516/2020-3). H.L. Umezu and P.G. Bittencourt-Silva are graduate student at the Physiology and Pharmacology graduate program at the UFMG/ICB and received scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and CNPq. V.R. Santos received FAPEMIG and CNPq research fundings (APQ-00521-21 and 423958/2018-6, respectively).

CRediT authorship contribution statement

Mourão Flávio A. G.: Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Formal analysis, Data curation. **Moreira Fabrício A.:** Writing – review & editing, Resources, Methodology. **Moraes Márcio Flávio D.:** Writing – review & editing, Visualization, Validation, Resources, Methodology, Data curation, Conceptualization. **Santos Victor R.:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Methodology,

Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. **da Silva Glauber S. F.:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. **Umezu Hanna L.:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Bittencourt-Silva Paloma G.:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Formal analysis.

Declaration of Competing Interest

The authors do not have any conflicts of interest to declare.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We would like to thank the staff members of the Department of Physiology and Biophysics (UFMG/ICB) who were involved in the care and handling of animals, as well as in maintaining the animal facilities essential to the success of this study. We also would like to thank our endo lab group that provides the infrastructure and scientific environment.

References

- Aiba, I., Noebels, J.L., 2015. Spreading depolarization in the brainstem mediates sudden cardiorespiratory arrest in mouse SUDEP models, 282ra46 *Sci. Transl. Med.* 7. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4050>.
- André, V., Pineau, N., Motte, J.E., Marescaux, C., Nehlig, A., 1998. Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2094-2106. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00223.x>.

- Authier, S., Arezzo, J., Pouliot, M., Accardi, M.V., Boulay, E., Troncy, E., Dubuc Mageau, M., Tan, W., Sanfacon, A., Mignault Goulet, S., Paquette, D., 2019. EEG: characteristics of drug-induced seizures in rats, dogs and non-human primates. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 97, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.03.004>.
- Bateman, L.M., Li, C.-S., Seyal, M., 2008. Ictal hypoxemia in localization-related epilepsy: analysis of incidence, severity and risk factors. *Brain* 131, 3239–3245. <https://doi.org/10.1093/brain/awn277>.
- Bernard, C., 2015. Spreading depression: epilepsy's wave of death, 282f514–282f514. *Transl. Med.* 7. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa9854>.
- Bialer, M., White, H.S., 2010. Key factors in the discovery and development of new anti-epileptic drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 68–82. <https://doi.org/10.1038/nrd2997>.
- Blum, A.S., 2009. Respiratory physiology of seizures. *J. Clin. Neurophysiol. Publ. Am. Electroencephalogr. Soc.* 26, 309–315. <https://doi.org/10.1097/WNP.0b013e3181b7f14d>.
- Borowicz, K.K., Banach, M., 2014. Antiarrhythmic drugs and epilepsy. *Pharmacol. Rep.* 66, 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.03.009>.
- Bozorgi, A., Lhatoo, S.D., 2013. Seizures, cerebral shutdown, and SUDEP. *Epilepsy Curr.* 13, 236–240. <https://doi.org/10.5698/1535-7597-13.5.236>.
- Brink, J.J., Cariglia, N., Stein, D.G., Galipeau, L.A., 1970. Uptake of [14C] pentylenetetrazol by developing rat brain. *Brain Res.* 19, 445–450. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90387-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90387-2).
- Buchanan, G.F., Murray, N.M., Hajek, M.A., Richerson, G.B., 2014. Serotonin neurons have anti-convulsant effects and reduce seizure-induced mortality. *J. Physiol.* 592, 4395–4410. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.277574>.
- Chen, Z., Brodie, M.J., Liew, D., Kwan, P., 2018. Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new anti-epileptic drugs: a 30-year longitudinal cohort study. *JAMA Neurol.* 75, 279. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3949>.
- da Silva, G.S.F., Li, A., Nattie, E., 2010. High CO₂/H⁺ dialysis in the caudal ventrolateral medulla (Loeschcke's area) increases ventilation in wakefulness. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 171, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.01.014>.
- Del Negro, C.A., Funk, G.D., Feldman, J.L., 2018. Breathing matters. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 351–367. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0003-6>.
- Devinsky, O., Hesdorffer, D.C., Thurman, D.J., Lhatoo, S., Richerson, G., 2016. Sudden unexpected death in epilepsy: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet Neurol.* 15, 1075–1088. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30158-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30158-2).
- Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T.J., Jette, N., Scheffer, I.E., de Curtis, M., Perucca, P., 2018. Epilepsy. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4 (1), 24. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.24>.
- Dhaibar, H., Gautier, N.M., Chernyshev, O.Y., Dominic, P., Glasscock, E., 2019. Cardiorespiratory profiling reveals primary breathing dysfunction in Kcnal1-null mice: implications for sudden unexpected death in epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 127, 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.04.006>.
- Dlouhy, B.J., Gehlbach, B.K., Kreple, C.J., Kawasaki, H., Oya, H., Buzza, C., Granner, M.A., Welsh, M.J., Howard, M.A., Wemmie, J.A., Richerson, G.B., 2015. Breathing inhibited when seizures spread to the amygdala and upon amygdala stimulation. *J. Neurosci.* 35, 10281–10289. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0888-15.2015>.
- Faingold, C.L., Randall, M., Tupal, S., 2010. DBA/1 mice exhibit chronic susceptibility to audiogenic seizures followed by sudden death associated with respiratory arrest. *Epilepsy Behav.* 17, 436–440. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2010.02.007>.
- Fallert, M., Dinse, H.R., Böhmer, G., Krämer, G., Baumgarten, R.V., 1978. Effects of pentylenetetrazol on respiration and bulbar respiratory neurones and its interaction with K⁺ ions and citrate. *Neuropharmacology* 17, 799–805. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(78\)90067-9](https://doi.org/10.1016/0028-3908(78)90067-9).
- Feldman, J.L., Mitchell, G.S., Nattie, E.E., 2003. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 239–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131103>.
- Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel Jr, J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B. i, Mathern, G. W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S., 2014. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>.
- Goldman, A.M., Buchanan, G., Aiba, I., Noebels, J.L., 2017. SUDEP animal models. In: Pitkänen, A., Buckmaster, P.S., Galanopoulou, A.S., Moshé, S.L. (Eds.), *Models of Seizures and Epilepsy* (Second Edition). Academic Press, pp. 1007–1018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804066-9.00070-5>.
- Haberer, L.J., Pollack, G.M., 1991. Central nervous system uptake kinetics of pentylenetetrazol in the developing rat. *Biopharm. Drug Dispos.* 12, 59–71. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510120107>.
- Hesdorffer, D.C., Tomson, T., Benn, E., Sander, J.W., Nilsson, L., Langan, Y., Walczak, T. S., Beghi, E., Brodie, M.J., Hauser, A., 2011. Combined analysis of risk factors for SUDEP (Mortality, for the I.C. on E.S. on). *Epilepsia* 52, 1150–1159. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02952.x>.
- Hirsh, K., Wang, S.C., 1974. Selective respiratory stimulating action of doxapram compared to pentylenetetrazol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 189, 1–11.
- Jackson, J.H., 1899. On asphyxia in slight epileptic paroxysms: on the symptomatology of slight epileptic fits supposed to depend on discharge-lesions of the uncinata gyrus. *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 3933 153, 79–80. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)79095-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)79095-2).
- Kalinowsky, L.B., 1986. History of convulsive therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 462, 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb51233.x>.
- Kim, Y., Bravo, E., Thirnbeck, C.K., Smith-Mellecker, L.A., Kim, S.H., Gehlbach, B.K., Laux, L.C., Zhou, X., Nordli, D.R., Richerson, G.B., 2018. Severe peri-ictal respiratory dysfunction is common in Dravet syndrome. *J. Clin. Invest.* 128, 1141–1153. <https://doi.org/10.1172/JCI94999>.
- Klippel Zanona, Q., Alves Marconi, G., de Sá Couto Pereira, N., Lazzarotto, G., Ferreira Donatti, A.L., Cortes de Oliveira, J.A., Garcia-Cairaso, N., Calcagnotto, M.E., 2022. Absence-like seizures, cortical oscillations abnormalities and decreased anxiety-like behavior in wistar audiogenic rats with cortical microgyria. *Neuroscience* 500, 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.07.032>.
- Lacuey, N., Zonjy, B., Hampson, J.P., Rani, M.R.S., Zaremba, A., Sainju, R.K., Gehlbach, B.K., Schuele, S., Friedman, D., Devinsky, O., Nei, M., Harper, R.M., Allen, L., Diehl, B., Millichap, J.J., Bateman, L., Granner, M.A., Dragon, D.N., Richerson, G.B., Lhatoo, S.D., 2018. The incidence and significance of peri-ictal apnea in epileptic seizures. *Epilepsia* 59, 573–582. <https://doi.org/10.1111/epi.14006>.
- Leirãõ, I.P., Silva, C.A., Gargaglioni, L.H., da Silva, G.S.F., 2018. Hypercapnia-induced active expiration increases in sleep and enhances ventilation in unanaesthetized rats. *J. Physiol.* 596, 3271–3283. <https://doi.org/10.1113/JP274726>.
- Leirãõ, I.P., Zoccal, D.B., Gargaglioni, L.H., da Silva, G.S.F., 2020. Differential modulation of active expiration during hypercapnia by the medullary raphe in unanesthetized rats. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 472, 1563–1576. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02455-5>.
- Löscher, W., 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new anti-epileptic drugs. *Seizure* 20, 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.003>.
- Löscher, W., 2017. Animal models of seizures and epilepsy: past, present, and future role for the discovery of antiseizure drugs. *Neurochem. Res.* 42, 1873–1888. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2222-z>.
- Lüttjohann, A., Fabene, P.F., van Luijtelaar, G., 2009. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol. Behav.* 98, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.005>.
- Marincovich, A., Bravo, E., Dlouhy, B., Richerson, G.B., 2021. Amygdala lesions reduce seizure-induced respiratory arrest in DBA/1 mice. *Epilepsy Behav.* EB 121, 106440. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.07.041>.
- Nashef, L., Garner, S., Sander, J.W., Fish, D.R., Shorvon, S.D., 1998. Circumstances of death in sudden death in epilepsy: interviews of bereaved relatives. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64, 349–352. <https://doi.org/10.1136/jnnp.64.3.349>.
- Nattie, E.E., 2001. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir. Physiol.* 129, 257–268. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00295-X](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00295-X).
- Ngugi, A.K., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Sander, J.W., Newton, C.R., 2010. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia* 51, 883–890. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02481.x>.
- Nilsson, L., Farahmand, B.Y., Persson, P.G., Thiblin, I., Tomson, T., 1999. Risk factors for sudden unexpected death in epilepsy: a case-control study. *Lancet* 353, 888–893. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)05114-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)05114-9).
- Pacheco-Barrios, Kevin, Navarro-Flores, A., Cardenas-Rojas, A., de Melo, P.S., Uygur-Kucukseymen, E., Alva-Diaz, C., Fregni, F., Burneo, J.G., 2022. Burden of epilepsy in Latin America and The Caribbean: a trend analysis of the Global Burden of Disease Study 1990 – 2019. *Lancet Reg. Health Am. S.* 8, 100140. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.100140>.
- Pietrobon, D., Moskowitz, M.A., 2014. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 379–393. <https://doi.org/10.1038/nrn3770>.
- Pinault, D., Slézia, A., Acsády, L., 2006. Corticothalamic 5–9 Hz oscillations are more pro-epileptogenic than sleep spindles in rats. *J. Physiol.* 574, 209–227. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.108498>.
- Pohl, M., Mares, P., 1987. Effects of flunarizine on metrazol-induced seizures in developing rats. *Epilepsy Res.* 1, 302–305. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(87\)90006-4](https://doi.org/10.1016/0920-1211(87)90006-4).
- Ramzan, I.M., Levy, G., 1985. Kinetics of drug action in disease states. XIV. Effect of infusion rate on pentylenetetrazol concentrations in serum, brain and cerebrospinal fluid of rats at onset of convulsions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234, 624–628.
- Rylyin, P., Nashef, L., Lhatoo, S.D., Bateman, L.M., Bird, J., Bleasel, A., Boon, P., Crespel, A., Dworetzky, B.A., Høgenhaven, H., Lerche, H., Maillard, L., Malter, M.P., Marchal, C., Murthy, J.M., Nitsche, M., Patarraia, E., Rabben, T., Rheims, S., Sadzot, B., Schulze-Bonhage, A., Seyal, M., So, E.L., Spitz, M., Szucs, A., Tan, M., Tao, J.X., Tomson, T., 2013. Incidence and mechanisms of cardiorespiratory arrests in epilepsy monitoring units (MORTEMUS): a retrospective study. *Lancet Neurol.* 12, 966–977. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70214-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70214-X).
- Sainju, R.K., Dragon, D.N., Winnike, H.B., Nashelsky, M.B., Granner, M.A., Gehlbach, B. K., Richerson, G.B., 2019. Ventilatory response to CO₂ in patients with epilepsy. *Epilepsia* 60, 508–517. <https://doi.org/10.1111/epi.14660>.
- Samokhina, E., Samokhin, A., 2018. Neuropathological profile of the pentylenetetrazol (PTZ) kindling model. *Int. J. Neurosci.* 128, 1086–1096. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1481064>.
- Shorvon, S., Tomson, T., 2011. Sudden unexpected death in epilepsy. *Lancet Lond. Engl.* 378, 2028–2038. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60176-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60176-1).
- Singh, A., Trevick, S., 2016. The Epidemiology of Global Epilepsy. *Neurol. Clin., Global and Domestic Public Health and Neuroepidemiology* 34, 837–847. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.015>.
- Tomson, T., Walczak, T., Sillanpaa, M., Sander, J.W.A.S., 2005. Sudden unexpected death in epilepsy: a review of incidence and risk factors. *Epilepsia* 46 (Suppl 11), 54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00411.x>.
- Uttl, L., Hložek, T., Mareš, P., Páleníček, T., Kubová, H., 2021. Anticonvulsive effects and pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD) in the pentylenetetrazol (PTZ) or N-methyl-D-aspartate (NMDA) models of seizures in infantile rats. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 94. <https://doi.org/10.3390/ijms23010094>.

- Van Erum, J., Van Dam, D., De Deyn, P.P., 2019. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy Behav.* 95, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.02.029>.
- Velisek, L., Kubova, H., Pohl, M., Stankova, L., Mares, P., Schickerova, R., 1992. Pentylentetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study. *Naunyn. Schmiede Arch. Pharmacol.* 346, 588–591. <https://doi.org/10.1007/BF00169017>.
- Velísková, J., Velíšek, L., Mares, P., Rokyta, R., 1990. Ketamine suppresses both bicuculline- and picrotoxin-induced generalized tonic-clonic seizures during ontogenesis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, 667–674. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90544-r](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90544-r).
- Velísková, J., Velíšek, L., 2017. Behavioral characterization and scoring of seizures in rodents. In: Pitkänen, A., Buckmaster, P.S., Galanopoulou, A.S., Moshé, S.L. (Eds.), *Models of Seizures and Epilepsy*. Academic Press, pp. 111–123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804066-9.00009-2>.
- Vilella, L., Lacuey, N., Hampson, J.P., Rani, M.R.S., Sainju, R.K., Friedman, D., Nei, M., Strohl, K., Scott, C., Gehlbach, B.K., Zonjy, B., Hupp, N.J., Zaremba, A., Shafiabadi, N., Zhao, X., Reick-Mitrisin, V., Schuele, S., Ogren, J., Harper, R.M., Diehl, B., Bateman, L., Devinsky, O., Richerson, G.B., Ryvlin, P., Lhatoo, S.D., 2019. Postconvulsive central apnea as a biomarker for sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP). *Neurology* 92, e171–e182. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006785>.
- Wenker, I.C., Teran, F.A., Wengert, E.R., Wagley, P.K., Panchal, P.S., Blizzard, E.A., Saraf, P., Wagnon, J.L., Goodkin, H.P., Meisler, M.H., Richerson, G.B., Patel, M.K., 2021. Postictal death is associated with tonic phase apnea in a mouse model of sudden unexpected death in epilepsy. *Ann. Neurol.* 89, 1023–1035. <https://doi.org/10.1002/ana.26053>.
- Yonekawa, W.D., Kupferberg, H.J., Woodbury, D.M., 1980. Relationship between pentylentetrazol-induced seizures and brain pentylentetrazol levels in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214, 589–593.
- Zienowicz, M., Wisłowska, A., Lehner, M., Taracha, E., Skórzewska, A., Maciejak, P., Płaźnik, A., 2005. The effect of fluoxetine in a model of chemically induced seizures—behavioral and immunocytochemical study. *Neurosci. Lett.* 373, 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.10.009>.