

AVALIAÇÃO POR ELETROENCEFALOGRAMA E LORETA SOBRE NOVA FORMA DE ESTIMULAÇÃO SONORA ANTICONVULSIVANTE CONTRA EPILEPSIAS REFRATÁRIAS (ESTUDO PILOTO)

Marília Marinho de Lucena¹, Igor Tchaikovsky Mello de Oliveira², Jeniffer Emídio de Almeida Albuquerque³, Juliana Carneiro Gomes⁴, Maíra Araújo de Santana⁵, Maria Karoline da Silva Andrade⁶, Wellington Pinheiro dos Santos⁷, Vinícius Rosa Cota⁸, Norberto Garcia-Cairasco⁹, Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa¹⁰, Marcelo Cairrão¹¹

¹ Doutoranda. Grupo de Neurodinâmica, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

² Doutorando. Grupo de Neurodinâmica, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

³ Mestre. Grupo de Neurodinâmica, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

⁴ Doutoranda. Laboratório de Instrumentação Biomédica e Sistemas Inteligentes em Saúde, Departamento de Engenharia Biomédica, (UFPE).

⁵ Doutoranda. Laboratório de Instrumentação Biomédica e Sistemas Inteligentes em Saúde, Departamento de Engenharia Biomédica, (UFPE).

⁶ Doutoranda. Laboratório de Instrumentação Biomédica e Sistemas Inteligentes em Saúde, Departamento de Engenharia Biomédica, (UFPE).

⁷ Docente. Laboratório de Instrumentação Biomédica e Sistemas Inteligentes em Saúde, Departamento de Engenharia Biomédica, (UFPE).

⁸ Docente. Laboratório Interdisciplinar de Neuroengenharia e Neurociências (LINNce), Departamento de Engenharia Elétrica, Universidade Federal de São João Del Rei – São João Del-Rei, Minas Gerais, Brasil.

⁹ Docente. Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental (LNNE), Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

¹⁰ Docente. Grupo de Neurodinâmica, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (DFF, UFPE).

¹¹ Docente. Grupo de Neurodinâmica, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (DFF, UFPE). Orientador.

Resumo

Trata-se de estudo piloto sobre a possível efetividade de uma estimulação acústica binaural não-periódica (ABAS) desenvolvida em nosso laboratório sobre descargas epileptiformes no eletroencefalograma (EEG) de pacientes com epilepsia refratária (exp 1). Também buscou-se conhecer os efeitos diferenciais dessa estimulação, comparados com ruído branco, sobre o cérebro de voluntários saudáveis através de sLORETA (exp 2). Resultados: no experimento 1 foi observado redução significativa do número de descargas epileptiformes no EEG de pacientes com epilepsia refratária durante e após a aplicação do som ABAS. No experimento 2, verificou-se que o ABAS ativa áreas corticais completamente diferentes em comparação ao ruído branco. Em conjunto, as áreas ativadas pelo ABAS contemplam quase a totalidade do circuito de rede em modo padrão (DMN). Sabe-se que a DMN está reduzida em pacientes com epilepsia. Conclusão: em conjunto, estes dois experimentos apontam para um efeito anticonvulsivante do ABAS.

Autorização legal: Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 79271517.2.0000.5208)

Palavras-chave: EEG; não-farmacológico; tratamento;

Apoio financeiro: CAPES (3 bolsas de mestrado e 2 bolsas de doutorado).

Introdução

A epilepsia afeta em torno de 65 milhões de pessoas ao redor do mundo (Thurman et al., 2011). Cerca de um terço dos pacientes é refratário a qualquer tratamento farmacológico e apenas metade pode ser beneficiada por cirurgia (Lee et al., 2012). Existe uma demanda por novos tratamentos não-farmacológicos sobretudo para a epilepsia refratária.

As crises epilépticas são baseadas no aumento do sincronismo de disparo de neurônios (Engel, 1995). O EEG consiste numa técnica muito importante para registro da atividade elétrica do cérebro, sendo fundamental para diagnóstico e acompanhamento das epilepsias e também para diferenciar fases do sono. Sabe-se da intensa relação entre sono e epilepsia. Durante o sono não-REM, enquanto as fases do sono progridem, existe um progressivo aumento no número de descargas epileptiformes interictais, mas que reduzem ou cessam

abruptamente com a chegada do sono REM (Mallow et al., 1997). O sono não-REM, por si só, é um evento fisiológico de aumento de sincronismo neuronal, e facilita eventos hipersincronizantes, como a epilepsia.

Dentre as abordagens não-farmacológicas para controle de epilepsia, surge o NPS (*non-periodical stimulation*) (Cota et al., 2009; Oliveira et al., 2014). O NPS consiste na estimulação elétrica profunda não-periódica no cérebro de ratos em modelos de epilepsia, com consistente efeito anticonvulsivante (Cota et al., 2009). Acredita-se que a estimulação não-periódica seja capaz de dessincronizar os neurônios, retardando ou evitando a instalação da epilepsia. No entanto, o implante e estimulação profunda do cérebro humano possui severas limitações trazidas pelos riscos da cirurgia, infecções, custo de manutenção do estimulador entre outros. Neste contexto, nosso laboratório desenvolveu um outro tipo de estimulação não-periódica através de estimulação acústica binaural, denominado ABAS (*aperiodic binaural acoustic stimulation*, patente depositada no INPI sob o número BR102019009701-9). O objetivo do presente estudo piloto é verificar se o ABAS seria capaz de reduzir o número de descargas epileptiformes interictais em pacientes refratários. Outro objetivo é comparar, em voluntários saudáveis, se o ABAS ativa áreas corticais diferentes de uma estimulação acústica convencional (ruído branco), através de sLORETA.

A epilepsia afeta cerca de 65 milhões de pessoas ao redor do mundo (Thurman et al., 2011). Aproximadamente um terço dos pacientes não obtém controle adequado das crises com tratamento farmacológico e apenas a metade destes pode ser beneficiada por cirurgia (Lee et al., 2012). Esse quadro de refratariedade induz uma demanda por novos tratamentos.

A estimulação elétrica do sistema nervoso é uma das principais abordagens não-farmacológicas para controle de epilepsia. Dentre as modalidades existentes, a NPS (*non-periodical stimulation*) é uma abordagem experimental de estimulação elétrica profunda, com robusto efeito anticonvulsivante (Cota et al., 2009; Medeiros et al., 2012, Oliveira et al., 2014; 2018; 2019). Acredita-se que a estimulação não-periódica seja capaz de impedir a sincronização das redes neurais indispensável à ictogênese ou à epileptogênese (Engel, 1995; Cota et al., 2019). No entanto, o implante e estimulação profunda do cérebro humano possui severas limitações trazidas pelos riscos da cirurgia, custo de manutenção do estimulador entre outros e, portanto, alternativas não-invasivas são preferíveis.

Neste contexto, nosso laboratório desenvolveu uma forma de estimulação não-periódica acústica binaural, denominado ANPS (*acoustic nonperiodical stimulation*, patente depositada no INPI sob o número BR102019009701-9). O objetivo do presente estudo piloto é verificar se o ANPS é capaz de reduzir o número de descargas epileptiformes interictais em pacientes refratários.

Sabe-se da intensa relação entre sono e epilepsia. Durante a progressão do sono não-REM, existe um gradual aumento no número de descargas epileptiformes interictais, mas que reduzem ou cessam abruptamente com a chegada do sono REM (Mallow et al., 1997). Efetivamente, o sono não-REM, por si só, é um evento fisiológico de aumento de sincronismo neural e facilita eventos hipersincronizantes, como a epilepsia, tornando-se uma janela privilegiada para avaliar a ANPS. O eletroencefalograma (EEG) foi escolhido como sinal para avaliar sincronismo e conectividade em voluntários saudáveis submetida à ABAS. Adicionalmente, buscou-se avaliar se a ANPS ativa áreas corticais diferentes de uma estimulação acústica convencional (ruído branco) usando o algoritmo sLORETA.

Metodologia

Experimento 1. Após recrutamento no Ambulatório de Epilepsia do HC-UFPE, solicitou-se que 10 pacientes retornassem ao hospital (em data oportuna) com privação de sono (4h) na noite anterior. Ao chegar ao hospital, sempre durante a manhã (experimento iniciava entre 8:30 e 9h), foram posicionados 19 eletrodos de eletroencefalograma pelo sistema 10-20, acoplado a amplificador (Neuron-SPECTRUM-4 EP EEG digital taxa de amostragem 500 Hz, passabanda filtrado em 0,5-35 Hz). Solicitou-se que os pacientes dormissem por 65 min, em sala com isolamento acústico e penumbra. Enquanto dormia, seu sono era monitorado por EEG, pelos motivos: 1. quantificar as descargas epileptiformes (espículas de potencial de campo) e 2. garantir que todos registros do experimento fossem realizados durante o sono não-rem (n-REM). O período de sono do paciente foi dividido em três momentos: antes do som (BS, de *before sound*, 20 min), durante o som (S, *sound*, 20 min) e após o som (AF, *after sound*, 20 min). Após o período BS foram posicionados fones de ouvido, e o ANPS foi ligado, e seu volume foi aumentado numa rampa com 5 min de duração (procedimento que não acordava os pacientes). O número de descargas epileptiformes nos períodos BS, S e AS foram quantificados. As descargas epilépticas interictais foram quantificadas por inspeção visual. Foi utilizado o formato clássico de identificação, que engloba as espículas e *sharp waves* coletivamente sob a denominação SSW (*spikes and sharp waves*) (Gotman; Gloor, 1976). Os trechos de 20 minutos (BS, S and AS) foram divididos em 20 épocas de 1 minuto. Estas épocas foram analisadas por dois pesquisadores independentes de forma cega. Estes dois pesquisadores foram previamente treinados por dois neurologistas experientes na identificação. Estatística realizada foi por teste t pareado comparando-se as SSW nos períodos BS, S and AS e a normalidade foi checada pelos testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Foi considerado um $p < 0,05$ como significativo.

Também buscou-se conhecer os efeitos diferenciais dessa estimulação, comparados com ruído branco, sobre o cérebro de voluntários saudáveis através de sLORETA (experimento 2). Foram recrutados 15 voluntários saudáveis (ambos os sexos, 18 a 30 anos, 10 mulheres), que compareciam ao Laboratório de Neurodinâmica da

UFPE. Esses voluntários eram registrados com EEG de alta densidade (64 canais, GHlamp, Au) durante a exposição ao som ABAS (10 min) ou ruído branco (10 min), em ordem aleatória. Efetuou-se análise da comparação das fontes geradoras de corrente através do programa s-LORETA entre os períodos ruído branco e ABAS.

Em ambos os experimentos o limiar auditivo para detecção do som foi mensurado. Antes de realizar o EEG, o ruído branco ou ABAS foi tocado a partir do computador, com volume inicial zero. Então, a intensidade sonora era gradualmente aumentada em etapas de 1% de incremento, até que o participante relatasse ter iniciado ouvir o estímulo. As estimulações foram realizadas 30 dB acima do limiar.

Resultados e Discussão

Experimento 1. Dentre os 10 pacientes epiléticos refratários que aceitaram participar da pesquisa, apenas 4 apresentaram descargas epileptiformes no EEG durante o sono, e foram incluídos no experimento. Nenhum deles entrou em sono REM nos 65 min registrados de seu sono, e que foram incluídos na análise.

A maioria dos pacientes incluídos no estudo apresentaram epilepsia focal fronto-temporal. O período após o som (AS) foi marcado por uma robusta redução no número de descargas epileptiformes interictais (Figura 1). Todas as comparações feitas independentemente pelos dois pesquisadores foram estatisticamente significantes para esta redução. Ainda em dois pacientes, foi vista uma redução nas descargas epileptiformes quando o som foi ligado (S) comparado ao período antes do som (BS) (paciente 1 BS= 443, S period=194, $p= 0,01$; paciente 4, BS= 96, S= 43, $p=0,007$).

Experimento 2. A primeira linha da Figura 2 (Fig 2A) representa a comparação entre a ativação cortical do ruído branco comparado ao período basal (silêncio). O ruído branco ativa o córtex auditivo primário (Fig. 2A, esquerda, área de Broadman (BA) 41. Também o uncus (BA 28) e o giro temporal médio (BA 21) estão ativados nesta condição. A segunda linha (Fig. 2B) representa o efeito do ABAS comparado ao período basal (silêncio). A terceira linha (Fig. 1C) representa o período quando o sujeito ouviu ABAS comparado ao ruído branco. As figuras 2B e 2C são muito similares, e a principal ativação em ambas diferem muito do efeito do ruído branco sozinho (Fig. 2B). Quando comparado ao ruído branco, o ABAS (Fig. 1B, esquerda) causou ativação predominante do precuneus (BA7, Fig. 2C anterior). Existe também atividade nos lobos temporal médio e inferior (BA 21 e BA38, respectivamente). Na Fig. 2C existe também grande atividade no córtex frontal inferior medial (BA11), BA 47 (frontal inferior, *pars orbitalis*), BA 46 (área frontal média, córtex pré-frontal dorsolateral, DLPFC), BA 9 (córtex frontal dorsolateral e médio) e BA 8 (córtex frontal e campo ocular frontal *frontal ocular field*). Estas áreas frontais formam um “halo”, excluindo o córtex pré-frontal frontopolar (BA10) e internamente o cíngulo anterior dorsal (BA32).

Os dados atuais do Experimento 1 sugerem que o ABAS possui o potencial em reduzir o número de descargas paroxísticas interictais no EEG de pacientes com epilepsia refratária. Um possível mecanismo pode ser bem semelhante à dessincronização da atividade elétrica encefálica observada em modelos animais de epilepsia submetidos à estimulação profunda não-periódica (Cota et al. 2009, 2016; Oliveira et al., 2014, 2018). Na atividade focal epileptiforme cortical induzida pela penicilina no gato, a dessincronização do eletrocorticograma induziu a supressão da atividade epileptiforme cortical (Wagner II, et al, 1975). Os presentes resultados de contagem de SSW foram realizados durante sono não-REM. Esta estratégia foi adotada para aumentar a probabilidade de ocorrência das SSW. Como nenhum paciente incluído na pesquisa apresentou sono REM, seria esperado que a sequência de épocas BS, S e AS houvesse aumento progressivo no número de SSW (Mallow et al, 1997). Mas o que atualmente vimos foi uma redução no número de SSW. A única explicação para tal fato seria o efeito anticonvulsivante do ABAS.

Os dados do Experimento 2 demonstram que a estimulação ANPS aumenta a atividade da rede em modo padrão (DMN, default mode network). A única diferença seria a não ativação da região BA 10 e BA32 (córtex frontopolar e cíngulo anterior, que fazem parte da DMN) pelo ANPS. A DMN representa áreas que estão ativadas quando o cérebro se encontra em situação de repouso, e inibidas quando existe engajamento emocional ou cognitivo em tarefas (Raichle & Snyder, 2007; Hwang et al. 2007; Harisson et al., 2011; Raichle, 2015). Sabe-se também que a DMN está menos ativa em pacientes com epilepsia (Gotman et al., 2005; Haneef et al., 2012; Jiang et al., 2018).

Juntos, os resultados do Experimento 1 e Experimento 2 apontam para um possível efeito anticonvulsivante em protocolos agudos, provavelmente envolvendo antagonismo de circuitos. É provável que a dessincronização *bottom-up* do estímulo acústico tenha interferido com o excesso de sincronismo epilético, e que este estímulo seja capaz de ativar a DMN, permitindo ao cérebro atividade típica de repouso. Tal fato é corroborado pelo aumento na qualidade de vida descrito pelos 10 pacientes, 30 dias depois de terem ouvido o ANPS por uma semana (dados não mostrados de experimentos crônicos).

Conclusões

O ANPS aparentemente consegue reduzir as descargas epiléticas interictais em pacientes com epilepsia refratária. A ANPS ativa a rede em modo padrão em voluntários saudáveis.

Este experimento piloto sugere efeito anticonvulsivante e uma provável nova abordagem a ser explorada no combate à epilepsia refratária.

Referências bibliográficas

- Cota, V. R., de Castro Medeiros, D., da Páscoa Vilela, M. R. S., Doretto, M. C., & Moraes, M. F. D. (2009). Distinct patterns of electrical stimulation of the basolateral amygdala influence pentylentetrazole seizure outcome. *Epilepsy & Behavior*, 14(1), 26-31.
- Cota, V. R., Drabowski, B. M. B., de Oliveira, J. C., & Moraes, M. F. D. (2016). The epileptic amygdala: toward the development of a neural prosthesis by temporally coded electrical stimulation. *Journal of neuroscience research*, 94(6), 463-485.
- Engel, J Jr (1995). Concepts of Epilepsy. *Epilepsia*. 36, 23-29.
- Gotman, J., Gloor, P. (1976) Automatic recognition and quantification of interictal epileptic activity in the human scalp EEG. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 41, 513-529.
- Gotman, J., Grova, C., Bagshaw, A., Kobayashi, E., Aghakhani, Y., & Dubeau, F. (2005). Generalized epileptic discharges show thalamocortical activation and suspension of the default state of the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(42), 15236-15240
- Lee, K. J., Shon, Y. M., & Cho, C. B. (2012). Long-term outcome of anterior thalamic nucleus stimulation for intractable epilepsy. *Stereotactic and functional neurosurgery*, 90(6), 379-385.
- Malow, B. A., Kushwaha, R., Lin, X., Morton, K. J., & Aldrich, M. S. (1997). Relationship of interictal epileptiform discharges to sleep depth in partial epilepsy. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*, 102(1), 20-26.
- de Oliveira, J. C., de Castro Medeiros, D., e Rezende, G. H. D. S., Moraes, M. F. D., & Cota, V. R. (2014). Temporally unstructured electrical stimulation to the amygdala suppresses behavioral chronic seizures of the pilocarpine animal model. *Epilepsy & Behavior*, 36, 159-164.
- de Oliveira, J. C., Maciel, R. M., Moraes, M. F. D., & Cota, V. R. (2018). Asynchronous, bilateral, and biphasic temporally unstructured electrical stimulation of amygdalae enhances the suppression of pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Epilepsy research*, 146, 1-8.
- Thurman, D. J., Beghi, E., Begley, C. E., Berg, A. T., Buchhalter, J. R., Ding, D., ... & Kroner, B. (2011). ILAE Commission on Epidemiology. *Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy*. *Epilepsia*, 52(suppl 7), 2-26.
- Wagner II, H. R., Feeney, D. M., Gullotta, F. P., & Cote, I. L. (1975). Suppression of cortical epileptiform activity by generalized and localized ECoG desynchronization. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 39(5), 499-506.
- Raichle, M. E., & Snyder, A. Z. (2007). A default mode of brain function: a brief history of an evolving idea. *Neuroimage*, 37(4), 1083-1090.
- Hwang, J. H., Li, C. W., Wu, C. W., Chen, J. H., & Liu, T. C. (2007). Aging effects on the activation of the auditory cortex during binaural speech listening in white noise: an fMRI study. *Audiology and Neurotology*, 12(5), 285-294.
- Harrison, B. J., Pujol, J., Contreras-Rodríguez, O., Soriano-Mas, C., López-Solà, M., Deus, J., ... & Cardoner, N. (2011). Task-induced deactivation from rest extends beyond the default mode brain network. *PloS one*, 6(7), e22964.
- Raichle, M. E. (2015). The brain's default mode network. *Annual review of neuroscience*, 38, 433-447.
- Haneef, Z., Lenartowicz, A., Yeh, H. J., Engel Jr, J., & Stern, J. M. (2012). Effect of lateralized temporal lobe epilepsy on the default mode network. *Epilepsy & Behavior*, 25(3), 350-357
- Jiang, L. W., Qian, R. B., Fu, X. M., Zhang, D., Peng, N., Niu, C. S., & Wang, Y. H. (2018). Altered attention networks and DMN in refractory epilepsy: A resting-state functional and causal connectivity study. *Epilepsy & Behavior*, 88, 81-86.