



Universidade Federal
de São João del-Rei

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS CENTRO-OESTE DONA LINDU
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

VITÓRIA REGINA FERNANDES

**ANÁLISE DA ASSIMETRIA MORFOLÓGICA E DE ASPECTOS
MOLECULARES DOS HIPOCAMPOS DE PACIENTES COM
EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL SUBMETIDOS A TRATAMENTO
CIRÚRGICO**

**DIVINÓPOLIS - MG
FEVEREIRO/2020**



Universidade Federal
de São João del-Rei

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS CENTRO-OESTE DONA LINDU
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

VITÓRIA REGINA FERNANDES

**ANÁLISE DA ASSIMETRIA MORFOLÓGICA E DE ASPECTOS
MOLECULARES DOS HIPOCAMPOS DE PACIENTES COM
EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL SUBMETIDOS A TRATAMENTO
CIRÚRGICO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São João Del Rei, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Luciana Estefani Drumond de Carvalho

**DIVINÓPOLIS - MG
FEVEREIRO/2020**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F363a Fernandes, Vitória Regina.
Análise da assimetria morfológica e de aspectos moleculares dos hipocampos de pacientes com epilepsia do lobo temporal submetidos a tratamento cirúrgico / Vitória Regina Fernandes ; orientadora Luciana Estefani Drumond de Carvalho. -- Divinópolis, 2020.
62 p.

Dissertação (Mestrado - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular) -- Universidade Federal de São João del-Rei, 2020.

1. Epilepsia do lobo temporal. 2. Hipocampo. 3. Apoptose. I. Carvalho, Luciana Estefani Drumond de, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI – UFSJ
INSTITUÍDA PELA LEI Nº.10.425 DE 19/04/2002 – D.O.U. DE 22/04/2002
CAMPUS CENTRO-OESTE DONA LINDU

Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular

ATA DE DEFESA DE TESE

DISCENTE: VITÓRIA REGINA FERNANDES

NÍVEL: MESTRADO

DATA DA DEFESA: 28/02/2020

HORÁRIO DE INÍCIO: _____ LOCAL: SALA 302 - BLOCO C - CCO Dona Lindu

MEMBROS DA BANCA		FUNÇÃO	TÍTULO	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM
NOME COMPLETO	CPF			
Luciana Estefani D. de Carvalho	03870956674	Presidente	Dr.	UFSJ
Leandro Augusto de O. Barbosa	076575807-55	Membro	Dr.	UFSJ
Márcio Flávio Dutra Moraes	109609648-00	Membro	Dr.	UFMG

TÍTULO DA TESE: "Análise da assimetria morfológica e de aspectos moleculares dos hipocampos de pacientes com epilepsia do lobo temporal submetidos a tratamento cirúrgico".

Em sessão pública, após apresentação da tese durante 50 minutos, a discente foi arguida oralmente pelos examinadores. Reunida em sessão secreta, às 11:50 a banca considerou a mestranda Vitória Regina Fernandes aprovada. Para constar, foi lavrada a presente ata, que é abaixo assinada pelos membros da banca e pela doutoranda.

Divinópolis, 28 de fevereiro de 2020.

Dra. Luciana Estefani Drumond de Carvalho Luciana Estefani Drumond de Carvalho

Dr. Leandro Augusto de Oliveira Barbosa Leandro Augusto de Oliveira Barbosa

Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes Márcio Flávio Dutra Moraes

Vitória Regina Fernandes Vitória Regina Fernandes

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG. Edital Demanda Universal Nº 01/2016 - Processo: APQ-01176-16.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Luciana Estefani Drumond de Carvalho, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, paciência e ensinamentos;

Aos professores Dra. Hérica Lima Santos, Dr. Leandro Augusto de Oliveira Barbosa e Dra. Vanessa Faria Cortes, por nos receber no LABIC e por todo apoio, sugestões e incentivo;

À FAPEMIG e à UFSJ, pelo apoio financeiro e pela bolsa;

À equipe do Núcleo Avançado de Tratamento das Epilepsias do Hospital Felício Rocho, pela colaboração neste estudo;

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Celular e do Laboratório de Membranas e ATPase, pelo suporte e companheirismo;

À Thamyres Figueredo Silva, pela ajuda imensa na parte morfológica e acessibilidade e interesse em me explicar e tirar dúvidas sempre;

À Grazielle Maia, pela dedicação infinita, disponibilidade e boa vontade de sempre ajudar, ensinar e tirar dúvida em tudo, pelo apoio e pelas risadas;

Ao Israel Garcia, por ter me ensinado na prática toda a técnica de *western blot*, por sempre estar disposto a ajudar e tirar dúvidas e pela amizade;

À Ítalo Diogo e Eduarda Leal, pela companhia nos experimentos, pelas risadas e pela amizade;

À Gisele Maia, por sempre ser tão solícita em ajudar, pelos conselhos, risadas, diversas caronas e pela amizade;

Aos meus pais e à minha irmã, por sempre me apoiarem em tudo e pelo carinho sempre.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	ix
I) INTRODUÇÃO	12
I.1) Epilepsia.....	12
I.1.1) Epilepsia do lobo temporal.....	14
I.2) Hipocampo	15
I.3) Excitabilidade neuronal	18
I.4) Apoptose	21
I.4.1) Via Intrínseca	23
I.4.2) Via Extrínseca.....	24
II) Justificativa	25
II.1) Hipótese	26
III) OBJETIVOS	26
III.1) Objetivo geral.....	26
III.2) Objetivos específicos.....	26
IV) MATERIAL E MÉTODOS	27
IV.1) Pacientes	27
IV.1.1) Aspectos Éticos	28
IV.2) Análise morfológica	28
IV.3) Análise molecular.....	29
IV.3.1) Preparação da amostra	30
IV.3.2) Quantificação de proteínas por <i>western blot</i>	30
IV.4) Análise estatística	31
V) RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
V.1) Pacientes	32
V.2) Análise morfológica	32
V.2.1) Comparação intragrupo de pacientes ELTE	33
V.2.2) Comparação intragrupo de pacientes ELTD	35
V.3) Análise molecular	37
VI) CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
Anexo 1.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF - Fator indutor de apoptose (*Apoptosis-inducing factor*)

AMPA - α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

Apaf-1 - Fator de ativação de apoptose 1

ATP - Adenosina trifosfato

BSA - Albumina sérica bovina (*Bovine serum albumin*)

CA - *Cornu ammonis*

ELT - Epilepsia do lobo temporal

ELTD – pacientes com ELT operados à direita

ELTE - pacientes com ELT operados à esquerda

EPM - Erro padrão da média

FADD - Domínio de morte associada a Fas

HtrA2/Omi - High-temperature-requirement protein A2

IAPs - Inibidores de proteínas apoptóticas

LTP - Potenciação de longa duração (*long term potentiation*)

NATE - Núcleo Avançado do Tratamento das Epilepsias

NMDA - N-metil D-aspartato

Smac/DIABLO - Second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TNF - Fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)

TNFR1 - Receptor de TNF 1

U.A. - Unidades arbitrárias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema para classificação de epilepsias.	13
Figura 2. Vista sagital do hipocampo onde se vê as regiões hipocampais.....	16
Figura 3. Mecanismos de excitotoxicidade	21
Figura 4. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose e como se comunicam	22
Figura 5. Esquema do delineamento experimental.	28
Figura 6. Segmentação manual no software Osirix™	29
Figura 7. Volume hipocampal esquerdo e direito de pacientes ELTE	33
Figura 8. Volume do hipocampo esquerdo e direito de pacientes ELTD	35
Figura 9. Expressão da subunidade GLUR1 do receptor AMPA.....	37
Figura 10. Expressão de subunidades da Na ⁺ ,K ⁺ ATPase.....	38
Figura 11. Expressão de proteínas da via de apoptose	39
Figura 12. Correlação de volume hipocampal e expressão de subunidade GLUR1 de receptor AMPA.....	43
Figura 13. Correlação entre volume hipocampal e expressão da subunidade da Na ⁺ , K ⁺ -/ATPase.....	44
Figura 14. Correlação de volumetria hipocampal e expressão de proteínas da via apoptótica.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos usados no <i>western blot</i>	31
Tabela 2. Dados dos participantes total da amostra, análise morfológica e análise molecular.....	32
Tabela 3. Volume do hipocampo total e de suas regiões. p-valor obtido no teste t <i>One Sample</i> comparando os resultados deste trabalho em pacientes ELTE com os da literatura. *p<0,05 (Boccardi <i>et al.</i> , 2015; Bartel <i>et al.</i> , 2017).....	34
Tabela 4. Volume do hipocampo total e de suas regiões. p-valor obtido no teste t <i>One Sample</i> comparando os resultados deste trabalho em pacientes ELTD com os da literatura. *p<0,05 (Boccardi <i>et al.</i> , 2015; Bartel <i>et al.</i> , 2017).....	36
Tabela 5. Expressão das proteínas de interesse em pacientes ELTE e ETLT.....	40

RESUMO

As epilepsias são desordens neurológicas manifestadas por crises epiléticas espontâneas e recorrentes, causadas por descargas neuronais hipersincronizadas. A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) possui alta prevalência e elevada farmacorresistência, podendo evoluir com alterações morfológicas e moleculares no hipocampo, sendo necessário tratamento cirúrgico. Este trabalho visa estudar os parâmetros morfológicos e fatores moleculares relacionados à excitabilidade e à apoptose em regiões hipocâmpais de pacientes com ELT com início ictal à direita ou esquerda, submetidos ao tratamento cirúrgico, considerando avaliar novos alvos neuroprotetores. A avaliação morfológica hipocâmpal foi realizada pela análise do volume em Ressonância Magnética e parte do tecido removido pela cirurgia foi avaliado por *western blot* para quantificar proteínas envolvidas com a excitabilidade (Na^+ , K^+ -ATPase e GluR1) e com a via apoptótica (fator indutor de apoptose [AIF], citocromo c, caspases 8 e 3). Adicionalmente, foi avaliado o índice de correlação entre os fatores morfológicos e moleculares. A amostra foi composta por 18 pacientes, 13 pacientes operados à esquerda (ELTE) e 5 operados à direita (ELTD). Houve diminuição significativa no lado do início ictal quando se compara volume hipocâmpal total e regiões de cabeça e cauda com o lado contralateral, tanto de ELTE como ELTD, exceto para cauda de ELTD. Quando comparado com valores de indivíduo normais, atrofia do lado do início ictal em pacientes ELTD e ELTE, além de atrofia da cauda do hipocampo contralateral de ELTE. Quanto à expressão proteica, não foram encontradas diferenças quando se compara pacientes ELTE e ELTD em tecido de cabeça ou cauda hipocâmpal. Além disso, sugere-se que há correlação negativa entre o volume e a expressão de caspase-3, AIF, citocromo c, GluR1, $\alpha 3$ e $\alpha 1$ na cauda hipocâmpal, e na cabeça hipocâmpal para caspase 3, caspase 8, AIF, citocromo c, FXRD2, $\alpha 3$ e $\alpha 1$. Caspase 8 teve correlação positiva com cauda. GluR1 e $\alpha 2$ não apresentaram correlação com volume da cabeça e $\alpha 2$ e FXRD2 com volume da cauda hipocâmpal. Em síntese, existe presença de atrofia do lado ipsilateral ao início ictal, além de haver correlação entre volume hipocâmpal e expressão de algumas proteínas analisadas. Entretanto não foi observada diferença molecular entre cabeça e cauda hipocâmpais em ELTE e ELTD, não sendo possível estabelecer especificidade quanto à lateralidade ou as regiões hipocâmpais.

Palavras chave: Epilepsia do lobo temporal, hipocampo, apoptose.

ABSTRACT

The epilepsies are neurological disorders manifested by spontaneous and recurring epileptic seizures, caused by hyper-synchronized neuronal discharges. Temporal lobe epilepsy (TLE) has high prevalence and resistance to drug treatment, with possible evolution causing morphological and molecular alterations in the hippocampus, making surgical intervention necessary to stop the evolution. This work aims to study the morphological parameters and molecular factors related to excitability and apoptosis in hippocampal regions of TLE patients with a right or left onset, who underwent surgery to evaluate new potential neuroprotection targets. Hippocampal morphological evaluation was performed by the volume determination using magnetic resonance imaging and part of the removed tissue during surgery was analyzed by western blot to quantify proteins involved in excitability (Na⁺, K⁺-ATPase and GluR1) and the apoptotic pathway (apoptosis inducing factor [AIF], cytochrome c, caspases 8 and 3). Moreover, the correlation coefficient of morphological and molecular parameters was evaluated. The sample was composed of 18 patients, 13 who had surgery on the left side (TLEL) and 5 who had surgery on the right (TLER) side. There was significant decrease in volume when comparing contralateral side of total hippocampus and its regions of TLER patients, except the hippocampal tail, of TLEL patients. Atrophy was observed when comparing volumes of healthy hippocampi and the ictal onset zone of both TLEL and TLER patients and atrophy of contralateral hippocampal tail in ELTE. Protein expression was not significantly different in neither hippocampal head or tail nor when comparing TLEL and TLED patients. Besides, it is suggested that there is a negative correlation between volume and the expression of caspase-3, AIF, cytochrome c, GluR1, α 3 and α 1 in hippocampal tail. Hippocampal head showed a negative correlation for caspase 3, caspase 8, AIF, cytochrome c, FXD2, α 3 and α 1. Caspase 8 showed a positive correlation with tail. GluR1 and α 2 did not show correlation with head volume neither do α 2 and FXD2 with head volume. In summary, there is atrophy in the ipsilateral to the ictal onset zone, in addition to the presence of correlation between hippocampal volume and expression of some of the proteins analyzed. However, no molecular difference was observed between hippocampal head and tail in ELTE and ELTD, thus, it isn't possible to establish specificity to the laterality or hippocampal regions.

Key words: Temporal lobe epilepsy, hippocampus, apoptosis.

I) INTRODUÇÃO

I.1) Epilepsia

Epilepsia é definida como um distúrbio neural caracterizado pela predisposição persistente em gerar crises epiléticas, definidas pela ocorrência transitória de sinais ou sintomas, que podem incluir alterações da consciência, ou eventos motores, sensoriais, autonômicos ou psíquicos involuntários percebidos pelo paciente ou por um observador, devidos à atividade anormal excessiva ou síncrona no cérebro (Fisher *et al.*, 2005; Thurman *et al.*, 2011). A epilepsia é caracterizada por pelo menos 2 crises epiléticas não provocadas (crises isoladas ou agrupadas dentro de um período de 24 horas, que ocorrem na ausência de um fator clínico precipitante e em uma pessoa sem histórico prévio compatível com epilepsia ocorridas num intervalo maior que 24 horas; ou uma crise epilética não provocada se a probabilidade de outras crises similar ao risco geral de recorrência de pelo menos 60%, após duas crises epiléticas não provocadas, ocorrendo nos próximos 10 anos; ou diagnóstico de uma síndrome epilética (Fisher *et al.*, 2014; Abe, 2020).

Afeta pessoas de todas as idades e apresenta uma alta prevalência. Estima-se que cerca de 65 milhões de pessoas mundialmente são afetadas (Johnson, 2019). Quase 80% das pessoas com epilepsia vivem em países de baixa e média renda. Esta maior concentração nestes países se deve a fatores como maior incidência de doenças como malária e neurocisticercose, problemas relacionados ao parto, maior número de acidentes automobilísticos e falta de acesso a programas de saúde preventiva e tratamento (Who, 2019).

Epilepsia afeta a independência, a saúde psicológica e o emocional dos pacientes. Restrições na obtenção de empregos, carteira de motorista e de educação podem ter impacto emocional e efeitos significativos na autoestima, nos relacionamentos pessoais, inclusive com membros da família, e até nas finanças pessoais. Há ainda um estigma que força muitos pacientes a esconderem sua condição (Beghi, 2016).

As crises epiléticas podem ser divididas em: de causa desconhecida, focais ou generalizadas. É dita desconhecida quando o início da crise não é observado ou obscuro; é chamada focal quando a origem se limita à rede em um hemisfério cerebral e generalizada quando a crise é iniciada e rapidamente engaja redes distribuídas bilateralmente (Berg *et al.*, 2010; Fisher *et al.*, 2017). Quanto aos tipos de epilepsia, diagnóstico de epilepsia generalizada é feito com base nos dados

clínicos, corroborados pelo achado de descargas interictais típicas no eletroencefalograma. Epilepsias focais incluem distúrbios unifocais e multifocais bem como crises envolvendo um hemisfério. O grupo de epilepsias com crises focais e generalizadas combinadas foi criado, já que existem pacientes que apresentam tanto crises focais como generalizadas. O termo “desconhecido” é usado para denotar a situação na qual sabe-se que o paciente tem epilepsia, mas o clínico é incapaz de determinar se o tipo de epilepsia é focal ou generalizado porque há pouca informação disponível. Pode não haver acesso ao EEG ou os estudos de EEG são não informativos, se mostrando normais, por exemplo (Scheffer *et al.*, 2017) (Figura 1).



Figura 1. Esquema para classificação de epilepsias. * indica início das crises epiléticas (Scheffer *et al.*, 2017).

O termo ictogênese se refere a formação de uma crise (De Curtis e Gnatkovsky, 2009), enquanto epileptogênese se refere ao processo em que um tecido assintomático se torna capaz de gerar crises epiléticas (Silva e Cabral, 2008). Epileptogênese pode advir de diversos fatores, que podem ser tanto genéticos, quanto ambientais. Porém, os eventos moleculares que geram à epileptogênese são pobremente elucidados e os mecanismos que levam à epilepsia são desconhecidos em muitos casos (Baruah *et al.*, 2020).

Em sua revisão, Mcnamara (1994) apresenta duas principais hipóteses para o envolvimento do hipocampo com o aumento da excitabilidade em epilepsia do lobo temporal. A hipótese de células em cesto dormentes de Sloviter (1991), propõe que a morte de neurônios particularmente susceptíveis à danos, como células musgosas, induzida pelas crises epiléticas, impede o recebimento de sinais excitatórios pelas células cesto, GABAérgicas, que então permanecem dormentes. Isto causa uma perda parcial da inibição, que, combinada com sinais sináptico excitatório devido a estímulos normais é postulado a levar à disparo excessivo das células granulares (Mcnamara, 1994; Konkiewitz e Junior, 2016).

Já a hipótese do brotamento das fibras musgosas de Nadler *et al.* (1980) propõe que o aumento da excitabilidade de células granulares decorre de rearranjo patológico do circuito neuronal em que as células granulares excitatórias inervam sítios sinápticos vazios delas mesmas, em decorrências da morte de células musgosas, criando circuitos monosináptico excitatórios recorrentes. É importante notar que ambas hipóteses não se excluem, sendo que ambas podem estar envolvida na geração de crises epiléticas (Andrade-Valença *et al.*, 2006; Cavarsan *et al.*, 2018).

I.1.1) Epilepsia do lobo temporal

Dentre as epilepsias focais, a epilepsia do lobo temporal (ELT) é a mais comum em adultos, com incidência de cerca de 40% entre pacientes epiléticos. Este tipo de epilepsia está relacionado com alterações no hipocampo, giro parahipocampal e amígdala (Allone *et al.*, 2017). Além disso, é um dos tipos de epilepsia que apresentam maior taxa de resistência ao tratamento medicamentoso. A epilepsia é considerada refratária quando não há diminuição sustentada na frequência das crises epiléticas após o uso de pelo menos duas medicações (monoterapia ou em combinação) indicadas para o tipo de epilepsia (Chang e Xu, 2018; Steinhoff e Staack, 2019).

Embora tratamento medicamentoso seja o principal tratamento contra epilepsias (Rho e White, 2018), sendo que cerca de 70% dos pacientes que façam uso correto de medicamentos antiepiléticos apresentem remissão prolongada há a presença de pacientes refratários a este tratamento (Hamandi, 2017). Estes pacientes com epilepsia refratária podem apresentar déficits cognitivos envolvendo memória episódica, memória verbal e fluência verbal, o que pode ser consequência

de patologia subjacente, crises repetidas ou terapia antiepiléptica prolongada. Nestes casos o tratamento cirúrgico é uma opção a ser considerada (Chaudhary *et al.*, 2017). Nestas cirurgias, a região onde as crises epiléticas são iniciadas é retirada, visando o mínimo possível de danos neuropsicológicos pós-cirúrgicos. A cirurgia pode levar a períodos longos sem crises e melhora na saúde. Com o passar do tempo, o tratamento cirúrgico tem levado a resultados cada vez melhores, sendo que em 47-70% dos casos o paciente fica livre de crises epiléticas. Em alguns casos de crises epiléticas persistentes após a cirurgia há a opção de uma reoperação (Amini *et al.*, 2015).

No caso da ELT mesial existem alguns tipos de cirurgias que podem ser realizadas. A mais comum é a lobectomia temporal anterior, conhecida também como *standard*. Neste tipo de cirurgia, além de estruturas do lobo temporal, como hipocampo, amígdala e estruturas parahipocampais, é também retirada uma porção anterior do lobo temporal. Com a intenção de evitar a retirada de tecido fora da zona ictal foi desenvolvida a amigdalohipocampectomia seletiva, onde não há ressecção do lobo temporal anterior e sim de grande parte do hipocampo, amígdala e estruturas parahipocampais (Hoyt e Smith, 2016). Porém, ambos tipos de cirurgia apresentam risco cirúrgico, além de poder gerar um déficit cognitivo, em especial na memória verbal, principalmente se o lado operado for o lado dominante (Spencer e Burchiel, 2012; Schaller e Cabrilo, 2016).

I.2) Hipocampo

O hipocampo humano é uma estrutura alongada, com cerca de 5 cm de comprimento, situada no lobo temporal medial. Sua semelhança com o formato de um cavalo marinho foi a inspiração para o nome hipocampo (Knierim, 2015; Fogwe e Mesfin, 2019). De acordo com a classificação de Lorente De Nó (1934), o hipocampo pode ser dividido em 4 áreas: *cornu ammonis* (CA) 1, CA2, CA3, CA4, sendo o CA1 uma continuação do subículo e CA4 a região na concavidade do giro denteado. As áreas CA2 e CA3 se encontram entre CA1 e CA4 (Schultz e Engelhardt, 2014). Além destas áreas, com um interesse cada vez maior em estudar os componentes da formação hipocampal para melhor entender a funcionalidade da estrutura, tem-se voltado para o estudo de suas regiões, estendidas ao longo do eixo anterior-posterior: cabeça, cauda e corpo (Figura 2) (Daugherty *et al.*, 2015).

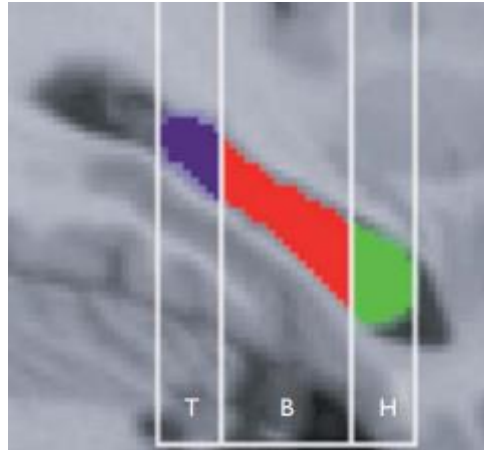


Figura 2. Vista sagital do hipocampo onde se vê as regiões hipocampais. H representa cabeça, B corpo e T cauda hipocampal (Chebat *et al.*, 2007).

O hipocampo está claramente envolvido na formação da memória declarativa (Bliss, 2007), que é a memória que envolve fatos e eventos, também chamada de memória explícita e também tem papel na navegação espacial (O'keefe e Dostrovsky, 1971). Os hipocampus direito e esquerdo são formados pelas mesmas regiões anatômicas, porém apresentam lateralidade cognitiva e molecular (Shimbo *et al.*, 2018).

A especialização unilateral pode permitir que estruturas cerebrais bilaterais façam uso do circuito de neurônios de forma diferente e mais efetiva. Porém, a natureza dos mecanismos que podem agir nas estruturas neurais para permitir diferentes funções cognitivas em cada hemisfério permanece desconhecida (Shipton *et al.*, 2014). Segundo Shipton *et al.* (2014), o hipocampo esquerdo tem maior papel quando a informação semântica é mais relevante em uma atividade, já o hipocampo direito se destaca quando se trata de informação espacial.

A revisão de (Moser e Moser, 1998) sugere que o hipocampo não age como uma estrutura unitária, sendo que suas porções ventral e dorsal apresentam funções diferente. Este argumento se baseia em: conexões de entrada e saída entre as regiões são diferentes entre si; memória espacial se mostrou mais relacionada a porção ventral; e que lesões na porção ventral aparentaram gerar resposta de estresse e de comportamento emocional (Fanselow e Dong, 2010). Em outros trabalhos mais recentes, foi observado que o volume da cauda do hipocampo direito está correlacionado com memória espacial e aprendizagem. Quando se trata da memória verbal, há indícios de que esta esteja relacionada com o volume da cabeça em ambos os lados ou com o corpo hipocampal esquerdo, não havendo consenso

na literatura (Hackert *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2010). Sendo que a cauda também está associada com o comportamento emocional. Análise detalhada de expressão genética suporta a segregação do hipocampo em zona ventral, intermediária e dorsal, sendo que também cada uma delas apresenta padrões de conectividade diferentes (Fanselow e Dong, 2010).

A subunidade NR2B do receptor de glutamato NMDA, é mais expressa na área CA3 do hipocampo esquerdo de camundongos quando comparado com a mesma região do hipocampo direito, o que provavelmente explica o motivo de ter sido observado, neste mesmo estudo, que a informação de CA3 para CA1 esquerdo gera mais potenciação de longa duração (*long term potentiation*; LTP) quando comparado com o direito, pois esta subunidade já foi mostrada como importante para indução de LTP, mostrando uma assimetria também de plasticidade (Kohl *et al.*, 2011). Também foi observada uma diferença na expressão de NR2B em células piramidais de CA1 entre o hipocampo direito e esquerdo de camundongos (Wu *et al.*, 2005).

Além disso, Pandis *et al.* (2006) mostra diferenças na densidade de receptores NMDA e AMPA, e de algumas de suas subunidades, entre hipocampo ventral e dorsal.

Uma análise proteômica de modelo de ratos de epilepsia do lobo temporal mostrou maior expressão de proteínas envolvidas na síntese de dopamina do hipocampo direito (Sadeghi *et al.*, 2017).

Em relação à epilepsia, Awerbuch *et al.* (1988) apresenta dados que indicam que pacientes com descargas epileptiformes interictais de origem no lobo temporal esquerdo tem mais incidência de crises generalizadas secundárias.

Quanto às características morfológicas, as imagens de ressonância magnética são muito úteis e frequentemente utilizadas para a investigação na epilepsia, pois permitem a distinção de massa branca e cinzenta e de espaços contendo fluidos, além de ser mais sensível e específica que imagens de tomografia computadorizada do cérebro (Chavakula e Cosgrove, 2017; Middlebrooks *et al.*, 2017). É comum a presença de perda celular extensiva no hipocampo de pacientes com ELT, assim como em outras regiões do sistema límbico, como a amígdala (Brandt *et al.*, 2004). A ELT e hipocampo são fortemente associados, sendo a esclerose hipocampal a alteração estrutural mais comumente encontrada nestes pacientes (Chatzikonstantinou, 2014). A esclerose hipocampal é reconhecida como

uma das principais causas da resistência medicamentosa em pacientes de ELT (Walker, 2015). Os mecanismos que causam a esclerose hipocampal ainda não foram totalmente decifrados, mas sabe-se que crises epilépticas repetidas levam à morte celular em áreas vulneráveis como o hipocampo, e que a apoptose é uma das vias envolvidas nestes processos de morte (Dericioglu *et al.*, 2013).

I.3) Excitabilidade neuronal

O glutamato é o mensageiro químico principal para neurotransmissão rápida (Meldrum, 2000). A liberação de glutamato por vesículas no terminal pré-sináptico é acionada pela entrada de cálcio na célula devido a um estímulo despolarizante. Sua liberação leva à estimulação de seus receptores, causando a ativação de cascatas de sinalização pós-sinápticas (Tamminga *et al.*, 2012).

O glutamato liberado na fenda sináptica, agindo em seus receptores metabotrópicos e ionotrópicos, como o α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), aparenta ter papel crucial na iniciação e propagação da atividade epiléptica. A cascata excitatória em redes de neurônios glutamatérgicos excitatórios conectados é considerado o principal mecanismo de hiperexcitabilidade neuronal (Di Bonaventura *et al.*, 2017).

Receptores AMPA são os receptores de glutamato ionotrópicos mais abundantes no cérebro humano localizados na membrana pós-sináptica, que medeiam a maioria das transmissões sinápticas excitatórias rápidas no cérebro, sendo assim são de extrema relevância na geração e propagação de atividade epiléptica. Quatro subunidades, GluR1-4, formam tetrâmeros, que podem ser homo ou heterotetrâmeros, sendo o segundo tipo mais comum, para dar origem ao núcleo funcional do canal iônico (Di Bonaventura *et al.*, 2017; Diering e Huganir, 2018). Na região CA1 hipocampal aproximadamente 80% dos receptores AMPA em sinapses excitatórias são do tipo GluR1/2 (Lu *et al.*, 2009).

A maior parte dos receptores AMPA são permeáveis a Na^+ e K^+ , mas não a Ca^{2+} . A abertura de canais do receptor AMPA causa despolarização da membrana, predominantemente devido ao influxo de íons de Na^+ (Rogawski, 2013). Receptores AMPA que não contém a subunidade GluR2 apresentam maior permeabilidade ao cálcio durante o estímulo de glutamato. Em modelo de epilepsia crônica em ratos foi vista que há uma maior diminuição proporcional de receptores GluR1/GluR2 do que

de GluR1/GluR1, o que torna o neurônio mais susceptível à excitotoxicidade (Egbenya *et al.*, 2018).

Outro componente que contribui para o controle da excitabilidade neuronal é a Na^+ , K^+ -ATPase, que é uma proteína de membrana que tem como principal função a manutenção das concentrações intracelulares de Na^+ e K^+ . Ela transporta três Na^+ para fora da célula e dois K^+ para dentro, com o gasto de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP), mantendo o gradiente eletroquímico que é essencial na manutenção do balanço osmótico da célula, do potencial de repouso de membranas em vários tecidos e de propriedades excitatórias do músculo e células nervosas (Blanco e Mercer, 1998). Sua disfunção já foi associada com diversas desordens neurológicas, como doença de Alzheimer, esquizofrenia, transtornos do humor e epilepsia (Hunanyan *et al.*, 2018), tendo atividade reduzida ou insuficiente para manutenção do balanço iônico adequado durante e após crises epiléticas, afetando a recaptação e o estímulo para liberação de glutamato e outros neurotransmissores que modulam a excitotoxicidade glutamatérgica (De Lores Arnaiz e Ordieres, 2014).

A Na^+ , K^+ -ATPase é expressa em todas as células de tecidos de mamíferos e é formada por duas subunidades essenciais: uma α e uma β . A subunidade catalítica é a α , enquanto a β é importante para montagem da enzima funcional e sua integração na membrana plasmática (Aperia, 2007). Existem 4 diferentes isoformas da subunidade α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$). Elas são expressas de forma tecido-específica, sendo que a subunidade $\alpha 1$ é expressa de forma ubíqua nos tecidos; $\alpha 2$ é expressa em astrócitos, oligodendrócitos e músculo; $\alpha 3$ é expressa em neurônios, glândula pineal e fotorreceptores da retina e $\alpha 4$ é expressa em testículos (Benarroch, 2011).

Há também uma terceira subunidade, chamada γ (FXD2), que não é necessária para a função normal da Na^+ , K^+ -ATPase. Esta subunidade é predominantemente expressa nos rins e tem um efeito funcional nas suas propriedades de transporte (Blanco e Mercer, 1998; Geering, 2006). Ela diminui a afinidade aparente da Na^+ , K^+ -ATPase por Na^+ intracelular e modula sua afinidade aparente por K^+ externo, dependendo do potencial de membrana (Crambert e Geering, 2003). Quanto à presença e função desta subunidade em tecido neural, a literatura apresenta poucos esclarecimentos. Estudos mostram que há presença de FXD2 no hipocampo de camundongos (Kassed *et al.*, 2004) e em alguns neurônios do gânglio da raiz dorsal (Wang *et al.*, 2015; Ventéo *et al.*, 2016).

Estudos sobre as epilepsias descrevem alterações na Na⁺, K⁺-ATPase. Em casos de epilepsias focais, pode haver uma diminuição na ativação da Na⁺, K⁺-ATPase via K⁺ extracelular, o que faz com que os neurônios continuem disparando o potencial de ação (Benarroch, 2011).

Em um modelo de camundongos de epilepsia, *Myshkin*, há uma mutação pontual no gene que expressa a subunidade $\alpha 3$, o que leva a uma proteína inativa. Esta mutação leva à hiperexcitabilidade neuronal, indicando a importância dessa subunidade no controle da excitabilidade (Clapcote *et al.*, 2009). A mutação E815k, que causa uma disfunção da isoforma $\alpha 3$, leva a um risco aumentado de surgimento de epilepsia (Helseth *et al.*, 2018). Há também indícios de que mutações na isoforma $\alpha 2$ (Deprez *et al.*, 2008), assim como camundongos heterozigotos *knockout* ATP1A2, $\alpha 2^{+/-}$ KOE21, que apresentam crises epiléticas espontâneas (Kinoshita *et al.*, 2016).

Neste contexto, uma disfunção nos mecanismo de controle da excitabilidade neural podem levar à ativação sustentada de receptor N-metil D-aspartato (NMDA) devido às concentrações anormalmente altas de glutamato, que leva a uma entrada maciça de Ca²⁺ na célula, que ativa diversas enzimas. Estes eventos levam a dano mitocondrial, aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio, conduzindo eventualmente à morte celular por apoptose. O déficit de energia também contribui para o processo degenerativo, perpetuando a despolarização da membrana, cortando suprimento de energia para a Na⁺, K⁺-ATPase e mantendo o receptor NMDA em estado ativo, o que leva à excitotoxicidade (Figura 3) (Lorigados *et al.*, 2013).

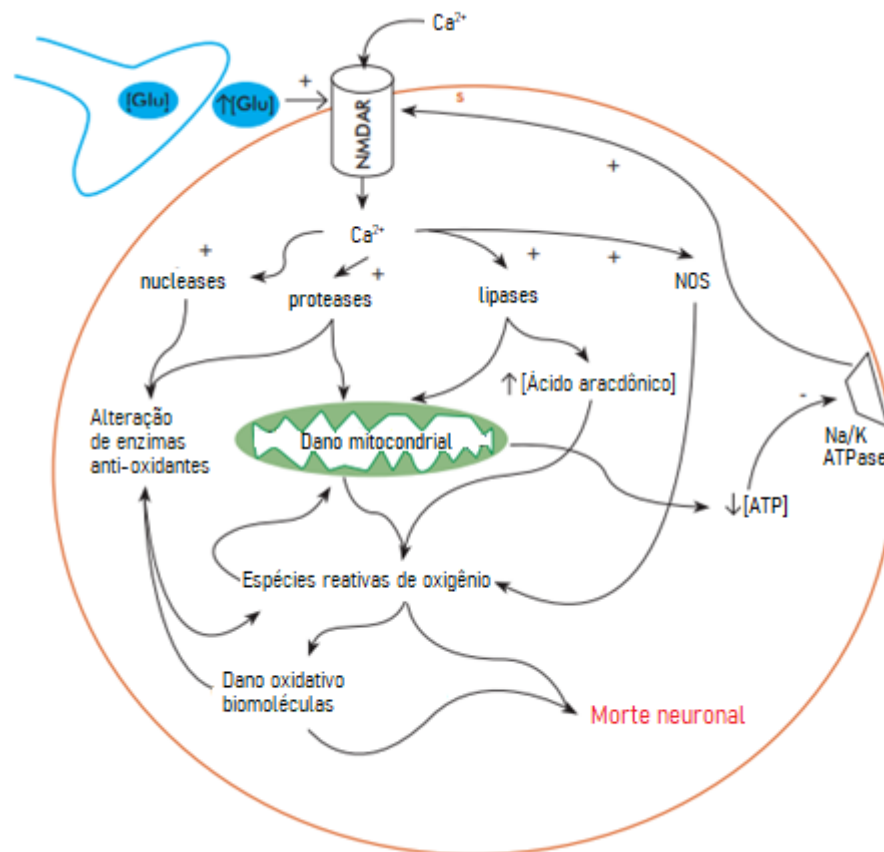


Figura 3. Mecanismos de excitotoxicidade. Constante ativação de receptores de glutamato leva ao aumento de Ca^{2+} intracelular, que desencadeia mecanismos de morte celular (Lorigados *et al.*, 2013).

Além de sua função na resposta mais imediata na célula, funcionando como uma bomba iônica, a Na^+ , K^+ -ATPase também pode funcionar como receptor e transdutor de sinais através de interações do tipo proteína-proteína. Como por exemplo, quando a ouabaína se liga à subunidade $\alpha 1$ vias de sinalização, como PI3K/Akt e PLC/PKC, podem ser ativadas (Liu *et al.*, 2018). Um outro exemplo é a possível ativação de IP3R, permitindo saída de Ca^{2+} do retículo endoplasmático para o citosol (Aperia, 2007), e sabe-se que Ca^{2+} intracelular em excesso pode ser tóxico (Pinton *et al.*, 2008).

I.4) Apoptose

A apoptose ocorre durante o desenvolvimento e envelhecimento e como mecanismo homeostático para manter a população celular em tecidos, mas pode também ocorrer como forma de defesa contra reações imunes, ou quando a célula está danificada além do reparo. Seus mecanismos são complexos e sofisticados e envolvem uma cascata molecular de eventos com gasto de energia. Há duas vias

principais: a via intrínseca (ou mitocondrial) e a via extrínseca (ou via por receptor de morte) (Figura 4) (Elmore, 2007).

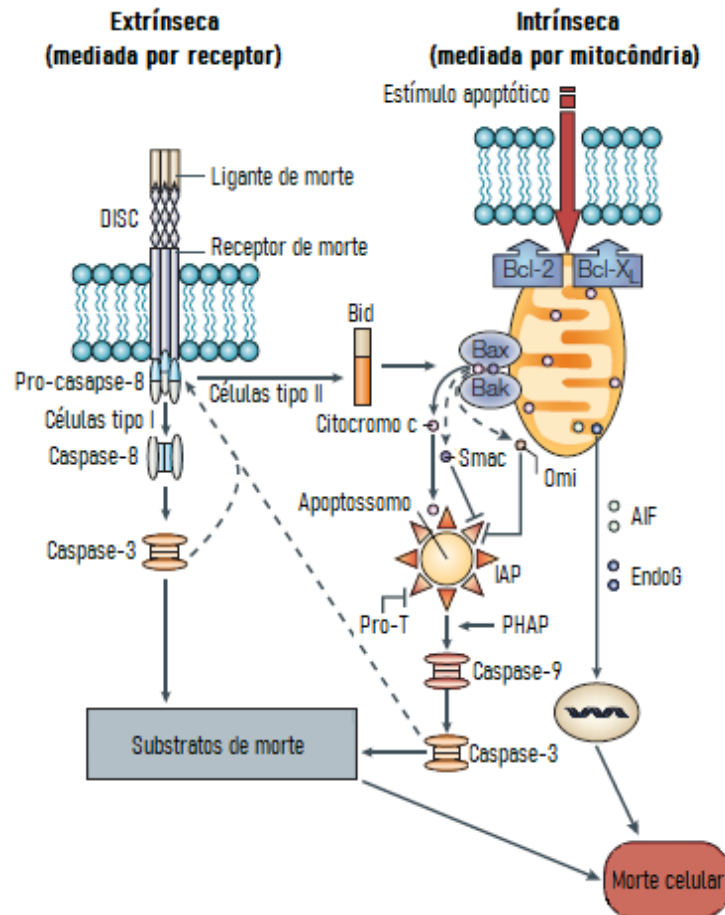


Figura 4. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose e como se comunicam (adaptado de Orrenius *et al.* (2003)).

Existem evidências de que a atividade de vias apoptóticas se mantem, mesmo após o período principal de morte celular seguindo o dano inicial, entrando também na epileptogênese (Henshall e Simon, 2005).

De acordo com Li *et al.* (2018) crises epilépticas recorrentes causam morte neuronal através de apoptose e necrose, além de levar a um déficit de memória progressivo. Os mecanismos que levam à morte celular causada por crises epilépticas podem envolver a ativação exacerbada de receptores de glutamato, levando a um aumento indevido das concentrações de Ca^{2+} intracelulares, levando à ativação de vias de morte celular (Henshall e Murphy, 2008).

I.4.1) Via Intrínseca

A via intrínseca é desencadeada pela perturbação da homeostase de organelas intracelulares ou dano no DNA. Diversos gatilhos são possíveis como níveis de Ca^{2+} intracelular elevados, radicais livres e interações de proteínas da família Bcl-2 (reguladoras pró e anti-apoptóticas) (Henshall, 2007).

De acordo com Waldbaum e Patel (2010) o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial são fatores chaves, que não só resultam de crises epilépticas, mas podem também contribuir para epileptogênese. A mitocôndria tem papel celular chave na produção de energia, mas sua importância vai além disso, pois também controla a apoptose em certas situações (Zhou *et al.*, 2018). Ela também é uma fonte importante de produção de espécies reativas de oxigênio durante crises epilépticas, além de ser um alvo proeminente de danos causados por espécies reativas de oxigênio (Shekh-Ahmad *et al.*, 2019). Também é crítica para a excitotoxicidade e morte celular, que de forma independente contribuem para a perda celular hipocampal (Waldbaum e Patel, 2010).

A mitocôndria sofre mudanças em estrutura e função quando a apoptose é estimulada e faz parte de sua via intrínseca. A ativação desta via induz à permeabilização da membrana mitocondrial, e a formação de poros na sua membrana permite a liberação de fatores apoptóticos para o citosol, como citocromo c, dentre outros (Cosentino e García-Sáez, 2014).

O citocromo c mitocondrial, uma proteína solúvel de 14kDa (Alvarez-Paggi *et al.*, 2017), normalmente se localiza nos espaços nas cristas da membrana mitocondrial interna (Ow *et al.*, 2008). Tem como função primária o transporte de elétrons (Babbitt *et al.*, 2015), porém, também pode ter um papel significativo na apoptose (Liu *et al.*, 1996). Uma vez liberado no citoplasma, o citocromo c se liga ao fator de ativação de apoptose 1 (Apaf-1), fazendo com que a pró-caspase-9 seja recrutada por complexos heptaméricos da Apaf-1, formando o apoptossoma, seguido da ativação da caspase-9, que por sua vez ativa as caspases 3 e 7 (Tait e Green, 2013).

As caspases são uma família de proteases que, na maioria dos casos, cliva seus substratos em resíduos de aspartato. A clivagem de seus substratos leva à mudanças importantes na célula como fragmentação de DNA, exposição da fosfatidilserina na superfície celular e formação de vesículas apoptóticas (Julien e Wells, 2017). As caspases são classificadas de acordo com similaridades estruturais

e funcionais, sendo separadas em caspases inflamatórias e caspases apoptóticas. O grupo de caspases inflamatórias consiste das caspases 1, 4, 5 e 12. As caspases apoptóticas se subdividem em iniciadoras e efetoras. As iniciadoras, 2, 8, 9 e 10, são caracterizadas por prodomínios longos. Dependendo do insulto, caspases iniciadoras específicas são ativadas e, por sua vez, clivam caspases efetoras, ativando-as. As caspases efetoras são as caspases 3, 6 e 7, caracterizadas por um prodomínio curto. Estas levam à morte, pois têm como alvo proteínas *housekeeping* e estruturais essenciais na célula (Songane *et al.*, 2018).

A localização intracelular das caspases é altamente regulada tanto na forma de zimogênio, quanto na forma processada. A pró-caspase 3 pode ser encontrada em fração citosólica e mitocondrial, 7 e 8 somente no citosol e 2 em fração citosólica, mitocondrial e nuclear. Já em suas versões clivadas, foi visto que caspases 3, 8 e 9 estão presentes no citosol, 3 na fração mitocondrial, 7 na fração microsomal e 2 e 3 em fração nuclear (Zhivotovsky *et al.*, 1999).

Com a permeabilização mitocondrial, também são liberados os inibidores de proteínas apoptóticas (IAPs), *second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis* (Smac/DIABLO) e *high-temperature-requirement protein A2* (HtrA2/Omi), que então, facilitam a ativação de caspases, pois impedem a ação do IAP (Tait e Green, 2013).

A permeabilização da membrana mitocondrial pode permitir também a saída para o citosol de proteínas mitocondriais da via intrínseca independente de caspase (Tait e Green, 2013). Um exemplo é a liberação do fator indutor de apoptose (*Apoptosis-inducing factor*; AIF), que é uma proteína inicialmente expressa com 67 kDa, que é então importada para a mitocôndria e processada para sua forma madura com 62 kDa. Ela se encontra na membrana interna da mitocôndria, exposta principalmente para o espaço intermembranas. Durante a morte celular, o AIF é clivado por calpaína (ativada por níveis elevados de Ca^{2+}), liberando um fragmento pró-apoptótico de 57 kDa no citosol, que por sua vez, transloca para o núcleo, onde é capaz de causar a fragmentação de DNA e a condensação de cromatina (Orrenius *et al.*, 2015; Bano e Prehn, 2018).

1.4.2) Via Extrínseca

A via extrínseca é iniciada pela ligação de um ligante de morte, como por exemplo o fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*; TNF), a um receptor de

morte localizado na superfície da célula. Esta ligação leva ao recrutamento da proteína domínio de morte associada a Fas (FADD), o que leva à ativação de pró-caspase-8, que por sua vez inicia um processamento auto catalítico, gerando sua forma ativa: caspase-8. Uma vez ativada, a caspase 8 ativa caspases efetoras, como caspase-3, através de clivagem proteolítica ou indiretamente, através da clivagem de Bid (Fricker *et al.*, 2018).

Crises epilépticas fazem com que $TNF\alpha$ seja liberado, ativando o receptor de TNF 1 (TNFR1), podendo induzir morte celular por apoptose. Crises epilépticas que causam danos ao hipocampo induzem a formação de complexo de sinalização de TNFR1, incluindo FADD e possivelmente, a ativação de caspase-8. A ativação de caspase 8 pode preceder a disfunção mitocondrial após crises epilépticas em ratos, enquanto a sua inibição tem efeito neuroprotetor (Yamamoto *et al.*, 2006).

As vias intrínsecas e extrínsecas podem agir de forma isolada, em certas circunstâncias a via extrínseca pode necessitar de amplificação de sinal de morte via mitocôndria, como é o caso de células do tipo II (aquelas em que a quantidade de caspase-8 é insuficiente para ativar caspase-3 por conta própria) nestas células, caspase-8 cliva Bid, proteína pró-apoptótica da família Bcl-2, que é dirigida para a mitocôndria e desencadeia a clivagem de caspase-3 (Barnhart *et al.*, 2003; Lombard *et al.*, 2005).

II) Justificativa

Além da assimetria relacionada à morfologia e à função, foi demonstrado também que ocorrem diferenças moleculares, quando se considera a lateralidade e as regiões hipocâmpais. Em relação à epilepsia, alterações também já foram observadas entre as epilepsias do lobo temporal com início ictal à direita e à esquerda.

Neste contexto, o estudo das possíveis diferenças a nível molecular no hipocampo, considerando a lateralidade do início ictal e as suas regiões, torna-se interessante, pois apresenta possibilidade da descoberta de características que justifiquem maior predisposição à ictogênese e a danos em regiões específicas e desta forma poderia fomentar a investigação sobre a produção de fármacos mais específicos, que contribuam para diminuir os altos índices de farmacorresistência na Epilepsia do Lobo Temporal.

II.1) Hipótese

A epilepsia altera o controle da excitabilidade neural, promovendo a potencialização dos fatores de morte celular que cursam com a apoptose, favorecendo a esclerose hipocampal. A hipótese deste estudo considera que as alterações supracitadas podem se manifestar de forma assimétrica entre os lados e as regiões do hipocampo.

III) OBJETIVOS

III.1) Objetivo geral

Avaliar a diferença em parâmetros morfológicos e fatores moleculares relacionados à excitabilidade e à apoptose neural, em regiões hipocampais de pacientes com ELT submetidos ao tratamento cirúrgico.

III.2) Objetivos específicos

Avaliar os seguintes parâmetros, considerando a lateralidade do início ictal e as regiões do hipocampo:

1. Análise morfológica:

- Volume hipocampal total;
- Volume da cabeça hipocampal;
- Volume da cauda hipocampal.

2. Análise molecular:

- Quantificar expressão de GluR1, para avaliar a expressão do receptor de glutamato AMPA, proteína envolvida na excitabilidade;
- Quantificar expressão de Na⁺, K⁺-ATPase (subunidades α 1, α 2, α 3 e FXYD2), para avaliar proteínas envolvidas na excitabilidade;
- Quantificar expressão de citocromo c, para avaliar a via de apoptose intrínseca dependente de caspase;
- Quantificar expressão de AIF, para avaliar a via de apoptose intrínseca, independente de caspase;
- Quantificar expressão de caspase-8, para avaliar a via de apoptose extrínseca;

- Quantificar expressão de caspase-3, para avaliar a via de ativação da apoptose dependente de caspase;

3. Correlacionar os fatores morfológicos com os fatores moleculares.

IV) MATERIAL E MÉTODOS

IV.1) Pacientes

Foram incluídos no estudo pacientes com ELT resistentes ao tratamento medicamentoso, maiores de 18 anos, aos quais foram indicados tratamento cirúrgico pela equipe do NATE do Hospital Felício Rocho, localizado em Belo Horizonte, no período de 2016 a 2019. Foram excluídos pacientes de reoperação, pois a amostra de tecido destes pacientes é somente das bordas das estruturas, e com outras patologias neurológicas associadas, como tumores, que poderiam alterar os parâmetros analisados.

Neste projeto foram utilizados, para a análise morfológica, os exames pré-operatórios de Ressonância Magnética e parte do tecido removido pelo procedimento cirúrgico foi usada para a análise molecular. Além disso, foram coletados os seguintes dados dos prontuários dos pacientes: gênero, idade e a lateralidade da zona de início ictal da epilepsia.

Os pacientes foram divididos em dois grupos: aqueles operados à esquerda e aqueles operados à direita, considerando o lado em que há o início ictal. Para cada um desses grupos foram feitas as análises morfológicas e moleculares, subdividindo ainda os dados em cabeça do hipocampo e cauda do hipocampo (Figura 5).

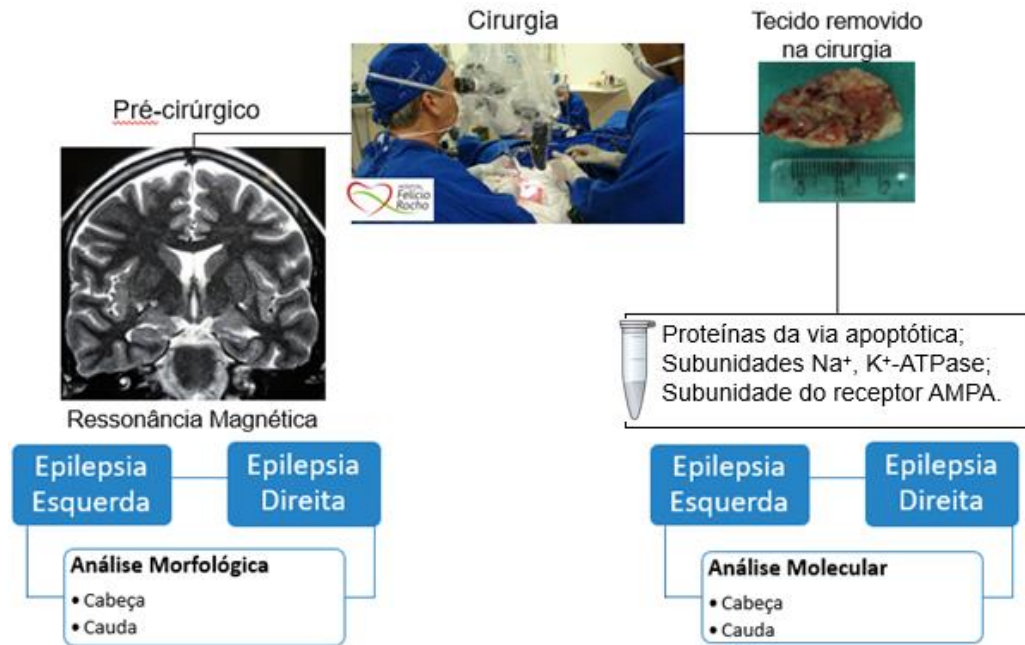


Figura 5. Esquema do delineamento experimental.

IV.1.1) Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelas comissões de ética da UFSJ (CAAE: 54549816.0.0000.5545) e do Hospital Felício Rocho (CAAE: 54549816.0.3001.5125) (Anexo 1). Todos os pacientes candidatos à cirurgia foram convidados a participar da pesquisa. Foi solicitado o acesso aos dados clínicos que estão arquivados no NATE e permissão para a utilização de uma parte do tecido removido durante a cirurgia para a realização dos testes moleculares. Foi assegurado ao paciente que não seria removido material biológico a mais para este estudo. A confiabilidade destas informações foi assegurada aos pacientes. Os pacientes foram incluídos no projeto após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

IV.2) Análise morfológica

Imagens de ressonância magnética pré-cirúrgicas dos pacientes, obtidas em equipamento de 1,5 Tesla, em corte coronal, em T1, foram utilizadas para a quantificação do volume hipocampal e de suas subáreas, cabeça e cauda de ambos os lados dos hemisférios encefálicos.

Foi usado um protocolo de segmentação hipocampal manual, realizado em triplicata para cada fatia (espessura de 3,5mm) e o *software* Osirix™ (Figura 6), para calcular a média do volume total do hipocampo e de suas regiões de cabeça e

cauda. Os limites para segmentação da cabeça hipocampal estabelecidos foram amígdala (dorsal) matéria branca do giro para-hipocampal (ventral), amígdala, giro do córtex entorrinal e líquido cefalorraquidiano (medial) e amígdala, líquido cefalorraquidiano, matéria branca do lobo temporal (lateral). Já os limites da cauda hipocampal estabelecidos foram líquido cefalorraquidiano (dorsal), matéria branca do giro parahipocampal (ventral), matéria branca parahipocampal, líquido cefalorraquidiano, indusium griseum (medial) e líquido cefalorraquidiano (lateral) (Kivisaari *et al.*, 2013).

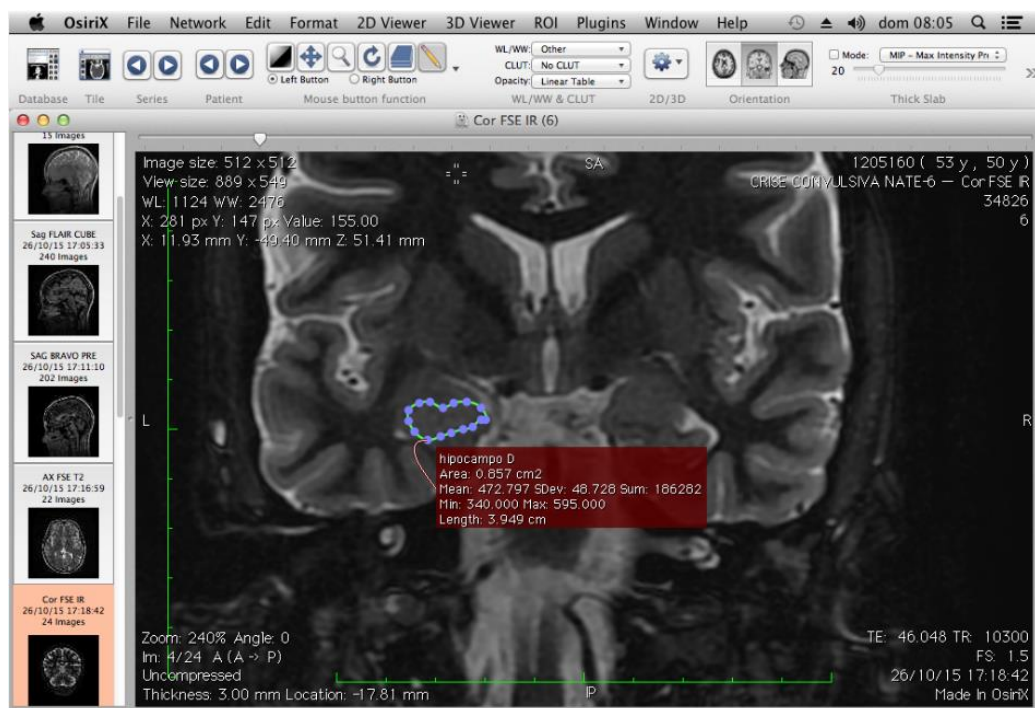


Figura 6. Segmentação manual no software OsiriX™. Ressonância Magnética em plano coronal indicando o hipocampo esquerdo já segmentado com contorno.

IV.3) Análise molecular

Amostras de tecido retiradas durante as cirurgias dos tipos, temporal seletiva e *standard*, de pacientes de ELT foram recolhidas com uma pinça. Foram coletadas separadamente cabeça e cauda hipocampal, as quais foram transportadas de Belo Horizonte a Divinópolis em gelo seco e armazenadas em tubos eppendorf à -80°C até o momento em que foram preparadas para a realização dos testes moleculares. Foi feita a avaliação do extrato total, onde foi quantificada a expressão de GluR1, subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e FXDY2 da Na^+ , K^+ -ATPase, citocromo c, AIF, caspase 8 e caspase 3 por *western blot*.

IV.3.1) Preparação da amostra

Para a obtenção de extrato total, as amostras foram homogeneizadas em homogeneizador do tipo Potter (MA099, Marconi), em tampão (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, sacarose 320 mM, EDTA 0,5 mM e MgCl₂ 1 mM, coquetel inibidor de protease 10%), em velocidade máxima, ou de forma manual com uso do pistilo do mesmo homogeneizador, determinado pelo tamanho da amostra, onde amostras maiores foram maceradas de forma automática e as menores de forma manual, de 6 a 20 vezes, de acordo com o número necessário para macerar todo o tecido e produzir o mínimo possível de espuma. O volume de tampão utilizado pelo peso de cada amostra segue a razão 5:1.

A dosagem de proteínas totais foi feita utilizando a metodologia colorimétrica de Bradford, com albumina sérica bovina (BSA) como padrão (Bradford, 1976).

IV.3.2) Quantificação de proteínas por *western blot*

As amostras foram preparadas em tampão de amostras (Tris-HCl 0,125 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,004%, 2-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, e SDS 4%) e água destilada para uma mesma quantidade de proteínas. Vinte ou oitenta µg de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida de 10 ou 12,5% para eletroforese. A eletroforese se deu a 90V, por cerca de 15 minutos iniciais e 100V por aproximadamente 2 horas. Em seguida, a transferência para a membrana de nitrocelulose foi feita por transferência semi-seca (Trans-blot SD Semy-dry transfer cell, BioRad, USA), a 25V por 30 minutos. Então, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau para verificar a eficácia da transferência. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com solução de leite desnatado 5% por uma hora e incubadas com anticorpo primário *overnight* a 4°C.

Os anticorpos primários utilizados estão listados na Tabela 1. A incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 2 horas se deu após cinco lavagens de 5 minutos com T-TBS (Tris-Base 100 mM, NaCl 0,9% e Tween 0,1%). As espécies imunorreativas foram visualizadas pelo processo de quimioluminescência, utilizando mistura de 2 soluções (solução 1: tris 100 mM pH 8,5, luminol 2,5 mM e ácido p-cumárico 0,396 mM; solução 2: tris 100 mM pH 8,5 e H₂O₂ 0,06%). A revelação das membranas foi realizada em fotodocumentador (L-PIX CHEMI, Loccus Biotecnologia). A normalização das proteínas foi feita através da

divisão do valor encontrado de expressão das proteínas alvo pelo valor da quantificação de β -actina, de expressão constitutiva na célula, para evitar que possíveis erros na concentração proteica adicionada ao gel de eletroforese interfiram nos resultados obtidos.

Tabela 1. Anticorpos usados no *western blot*.

<i>Anticorpo</i>	<i>Diluição</i>	<i># catálogo</i>	<i>Fabricante</i>
<i>anti-AIF</i>	1:500	SC-13116	Santa Cruz
<i>anti-caspase-8</i>	1:250	SC-81656	Santa Cruz
<i>anti-caspase-3</i>	1:250	SC-56053	Santa Cruz
<i>anti- β-actina</i>	1:500	SC-81178	Santa Cruz
<i>anti-isoforma α1</i>	1:200	SC-21712	Santa Cruz
<i>anti-isoforma α2</i>	1:250	CSB-PA020068	Cusabio
<i>anti-isoforma α3</i>	1:1000	MA3-915	Invitrogen
<i>anti-FXYD2</i>	1:250	SC-81876	Santa Cruz
<i>anti-citocromo C</i>	1:1000	#11940	Cell Signaling
<i>anti-GluR1</i>	1:1000	AB-1504	Millipore
<i>anti-mouse</i>	1:2000	SC-516102	Santa Cruz
<i>anti-rabbit</i>	1:4000	SC-2357	Santa Cruz

As bandas imunorreativas foram quantificadas por densitometria através do programa ImageJ 1.51 (National Institute of Health, USA), onde o *background* foi subtraído utilizando a metodologia descrita por (Gallo-Oller *et al.*, 2018) na qual o *background* para cada imagem foi criado através da função “subtrair *background*” com a opção “criar *background* – não subtrair” ativa, em um valor onde as bandas sumiam e somente o *background* fica visível. A partir daí foi usada a função “calculadora de imagem” para subtrair o *background* da imagem original.

IV.4) Análise estatística

O programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, USA) foi utilizado na análise dos dados e geração de gráficos. Para os dados com distribuição normal, de acordo com o teste de normalidade D’Agostino-Pearson, foi utilizado o teste t de *Student*. Para os dados com distribuição não gaussiana foram usados os teste Kruskal-Wallis. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando

$p < 0,05$. Os dados de volumetria foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados de quantificação proteica estão expressos como mediana (Q1 [quartil 1; 25%]; Q3 [quartil 3; 75%]).

Com auxílio do mesmo programa também foram realizados o teste *t one sample*, para comparar os valores de média obtidos na volumetria hipocampal com valores obtidos da literatura para hipocampos de indivíduos sem alterações neurológicas, ou seja, a média da população geral. O coeficiente de correlação de Spearman foi determinado para avaliar a relação entre as variáveis volumetria hipocampal e a expressão das proteínas.

V) RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1) Pacientes

Considerando todos dos quais foram obtidas as imagens de ressonância magnética e/ou amostra de tecido, há um total de 18 pacientes. De 6 pacientes (3 operados à esquerda e 3 à direita) foram obtidas tanto imagens de ressonância magnética, quanto amostras de tecidos. De 9 deles, sendo um operado à direita e 8 à esquerda, obtivemos somente imagens de ressonância magnética. De 3 pacientes, 1 operado à direita e 2 à esquerda, foram obtidas somente amostra de tecido. Imagens de ressonância magnética de 15 pacientes foram usadas e amostras de 9 pacientes foram usadas para as análises moleculares. Os números de pacientes ELTD e ELTE e médias de idade na data da cirurgia constam na Tabela 2.

A amostra é composta por adultos considerados jovens (Carvalho *et al.*, 2010), e com uma média homogênea de idade entre os grupos.

Tabela 2. Dados dos participantes total da amostra, análise morfológica e análise molecular.

	Total		Morfologia		Molecular	
	ELTE	ELTD	ELTE	ELTD	ELTE	ELTD
<i>Participantes</i>	13 (72%)	5 (28%)	11 (73%)	4 (27%)	5 (56%)	4 (27%)
<i>Média Idades</i>	39,1 \pm 2,7	38,5 \pm 3,9	39,3 \pm 2,9	38,5 \pm 3,9	29,6 \pm 1,8	37,8 \pm 3,4

V.2) Análise morfológica

Inicialmente foi feita a medida do volume do hipocampo total, e, separadamente, cabeça e cauda hipocampais, de pacientes operados à esquerda (ELTE) e à direita (ELTD).

V.2.1) Comparação intragrupo de pacientes ELTE

Comparando os volumes do hipocampo total (n=11) esquerdo e direito de pacientes ELTE é possível notar que o hipocampo esquerdo é significativamente menor ($p < 0,05$). Os valores obtidos foram: hipocampo total esquerdo $2,13 \pm 0,12 \text{ cm}^3$ e direito $2,91 \pm 0,14 \text{ cm}^3$ (Figura 7A). O mesmo ocorre para o volume da cabeça hipocampal em paciente com ELTE (Figura 7B), onde tem-se: esquerdo $0,83 \pm 0,08 \text{ cm}^3$ e direito $1,25 \pm 0,07 \text{ cm}^3$. Comparando os volumes da cauda hipocampal esquerda e direita em pacientes ELTE (Figura 7C) tem-se: esquerda: $0,48 \pm 0,04 \text{ cm}^3$ e direita: $0,64 \pm 0,07 \text{ cm}^3$.

Há uma alteração estrutural no hipocampo total nestes pacientes, cabeça e cauda, onde o lado do início ictal, esquerdo neste caso, apresenta volume significativamente menor que no lado direito. Isto era esperado, uma vez que o lado esquerdo é o lado afetado nestes pacientes, e geralmente o lado ipsilateral apresenta atrofia mais proeminente (Duarte *et al.*, 2018).

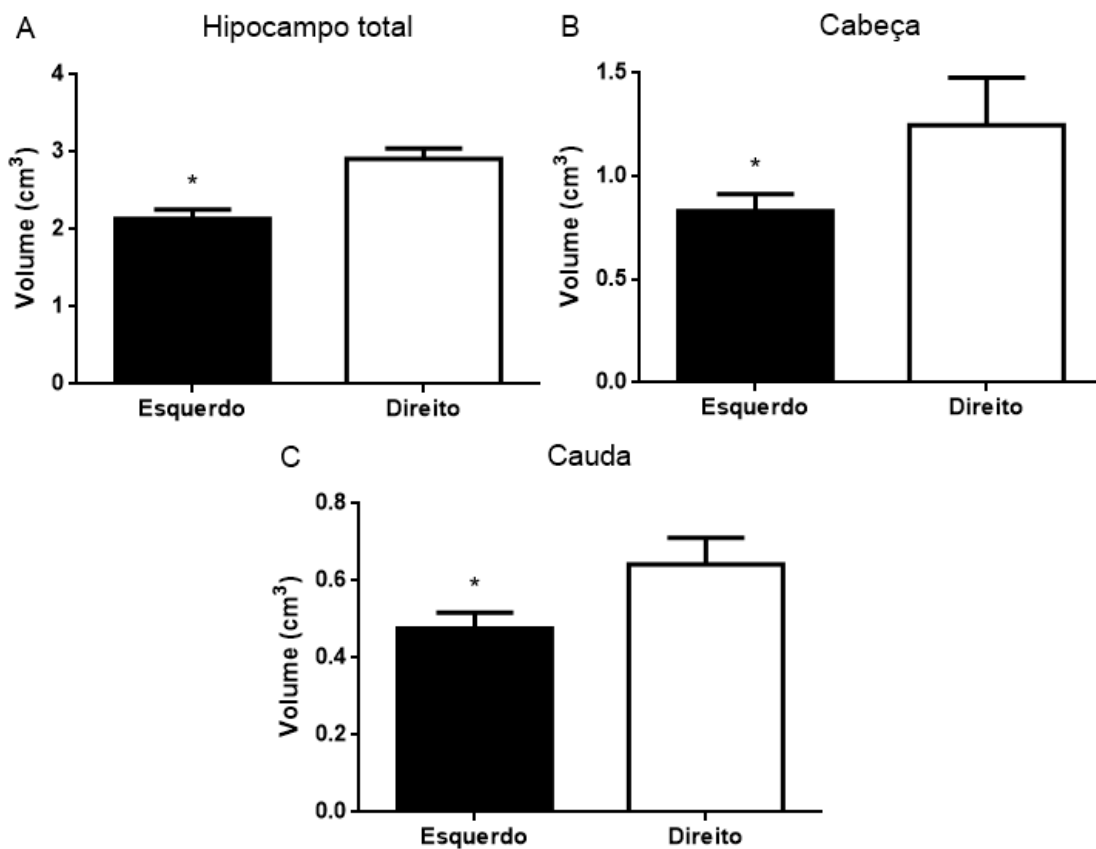


Figura 7. Volume hipocampal esquerdo e direito de pacientes ELTE. (A) Volume hipocampal total; (B) volume cabeça hipocampal (C) volume cauda hipocampal. n=11. * $p < 0,05$ Teste t de *Student* pareado.

De fato, o volume do hipocampo direito de um indivíduo saudável é naturalmente um pouco maior que o esquerdo, uma média de 3120 mm³ e 3060 mm³ respectivamente (Boccardi *et al.*, 2015). Desta forma, considerando que a atrofia hipocampal é comumente assimétrica entre os lados e as regiões e pode ser unilateral ou bilateral na epilepsia, comparou-se os dados obtidos aos dados da literatura, também obtidos através de segmentação manual, para investigar se de fato houve atrofia hipocampal à esquerda e se o hipocampo contralateral, à direita, também teria sido acometido. Para as regiões estudadas, dado da literatura indica que o volume de cabeça hipocampal esquerda é de 1,350 cm³ e direita de 1,317 cm³. Já para cauda hipocampal dado da literatura indica que o volume a esquerda é de 0,790 cm³ e direita de 0,823 cm³ (Bartel *et al.*, 2017). Utilizando o teste t *One Sample* para comparar os valores que encontramos com os valores estimados da literatura (Tabela 3), observamos que o hipocampo esquerdo total, a cabeça esquerda e a cauda esquerda, apresentam diminuição de 30,4%, 37,1% e 39,2%, respectivamente, quando comparado com a literatura, enquanto o hipocampo direito total e cabeça direita não apresentam alterações. Estes resultados demonstram que há redução no volume hipocampal total e das regiões analisadas no lado afetado pela epilepsia comparando com dados de indivíduos que não apresentam atrofia hipocampal. Porém, o teste apontou uma diferença também na cauda hipocampal direita, de 21,9% em relação ao valor da literatura, mostrando que mesmo que o lado do início ictal seja esquerdo, a cauda direita também foi afetada, levando à sua atrofia.

Tabela 3. Volume do hipocampo total e de suas regiões. p-valor obtido no teste t *One Sample* comparando os resultados deste trabalho em pacientes ELTE com os da literatura. *p<0,05 (Boccardi *et al.*, 2015; Bartel *et al.*, 2017).

Região	Valor da literatura (cm³)	Valor obtido (cm³)	p-valor
<i>Hipocampo total esquerdo</i>	3,06	2,13	<0,0001*
<i>Hipocampo total direito</i>	3,12	2,91	0,16
<i>Cabeça hipocampal esquerda</i>	1,32	0,83	0,0001*
<i>Cabeça hipocampal direita</i>	1,35	1,25	0,17
<i>Cauda hipocampal esquerda</i>	0,79	0,48	<0,0001*
<i>Cauda hipocampal direita</i>	0,82	0,64	0,03*

V.2.2) Comparação intragrupo de pacientes ELTD

Comparando-se o volume dos hipocampus esquerdo e direito (n=4) em paciente ELTD (Figura 8A) tem-se: hipocampo total esquerdo: $3,28 \pm 0,15 \text{ cm}^3$ e direito: $2,36 \pm 0,19 \text{ cm}^3$. Quanto ao volume da cabeça do hipocampo esquerda e direita em pacientes ELTD (Figura 8B) tem-se: cabeça hipocampal esquerda: $1,49 \pm 0,15 \text{ cm}^3$ e direita: $0,96 \pm 0,07 \text{ cm}^3$. Já a média do volume da cauda esquerda e direita do hipocampo em pacientes ELTD (Figura 8C) tem-se: cauda hipocampal esquerda: $0,66 \pm 0,06 \text{ cm}^3$ e direita: $0,50 \pm 0,03 \text{ cm}^3$.

É possível notar que o hipocampo direito total e cabeça hipocampal apresentaram diminuição em relação ao volume contralateral, mostrando mais uma vez que o lado de início ictal foi mais afetado. Porém, não há diferença no volume da cauda hipocampal direita em relação à esquerda.

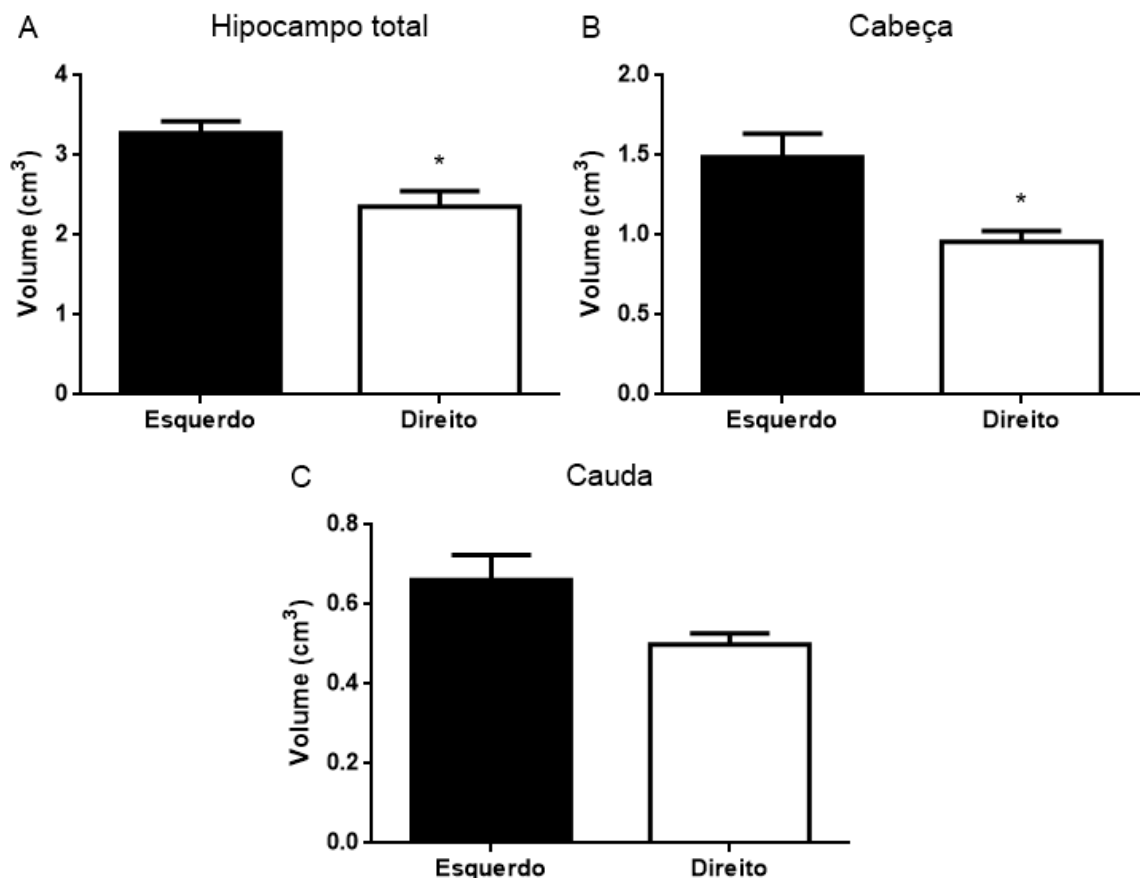


Figura 8. Volume do hipocampo esquerdo e direito de pacientes ELTD. (A) Volume hipocampal total; (B) volume cabeça hipocampal (C) volume cauda hipocampal. n=4. *p<0,05 Teste t de *Student* pareado.

Utilizando o teste t *One Sample* para comparar os valores obtidos com os valores da literatura citados anteriormente (Tabela 4), observamos que o hipocampo direito total, cabeça direita e cauda direita apresentam diminuição de 24,3%, 28,8% e 39,0%, respectivamente, quando comparados com a literatura, enquanto o hipocampo esquerdo total, cabeça esquerda e cauda esquerda não apresentam diferença. Estes resultados corroboram o indicativo de que ocorreu atrofia hipocampal no lado do início ictal. Além disso, indicam preservação da estrutura do hipocampo contralateral.

Tabela 4. Volume do hipocampo total e de suas regiões. p-valor obtido no teste t *One Sample* comparando os resultados deste trabalho em pacientes ELTD com os da literatura. *p<0,05 (Boccardi *et al.*, 2015; Bartel *et al.*, 2017).

Região	Valor da literatura (cm ³)	Valor obtido (cm ³)	p-valor
<i>Hipocampo total esquerdo</i>	3,06	3,28	0,23
<i>Hipocampo total direito</i>	3,12	2,36	0,03*
<i>Cabeça hipocampal esquerda</i>	1,32	1,49	0,33
<i>Cabeça hipocampal direita</i>	1,35	0,96	0,01*
<i>Cauda hipocampal esquerda</i>	0,79	0,66	0,13
<i>Cauda hipocampal direita</i>	0,82	0,50	0,0014*

Considerando que nos pacientes ELTE vimos, além da atrofia do lado de início ictal, uma atrofia na cauda contralateral, o que não foi observado em pacientes ELTD, estes pacientes poderiam apresentar um maior déficit funcional, pois apresentam danos no hipocampo contralateral também. De fato, estudos do nosso grupo de pesquisa mostram maior comprometimento em testes neuropsicológicos de pacientes com ELTE (dados não mostrados).

Outra característica interessante observada neste estudo foi a atrofia de cauda direita no grupo de início ictal à esquerda. De fato, a literatura indica uma facilitação de generalização secundária quando o início da crise está à esquerda (Fakhoury *et al.*, 1994). Este fato pode justificar uma facilitação de recrutamento e lesão de estruturas contralaterais quando o início ictal é à esquerda.

Com base nos resultados, que indicam que há assimetria morfológica, pois os pacientes com ELTE apresentaram não só atrofia no lado do início ictal, mas

também contralateralmente, indicando maior extensão da lesão e mais morte celular nestes pacientes do que em pacientes ELTD, investigamos também se há diferenças moleculares considerando a expressão de fatores apoptóticos e excitatórios em pacientes com ELT.

V.3) Análise molecular

A quantificação das proteínas de interesse foi realizada pela técnica de western blot. Segue abaixo a expressão gráfica dos dados através do box plot e em seguida uma tabela com a inclusão dos valores das medianas (Q1 [quartil 1; 25%]; Q3 [quartil 3; 75%]).

A expressão da subunidade GluR1 do receptor AMPA foi mensurada em regiões hipocampais de pacientes ELTE e ELTD (Figura 9).

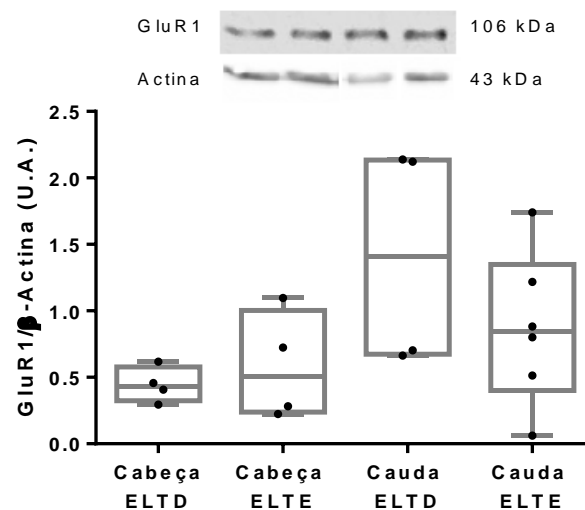


Figura 9. Expressão da subunidade GLUR1 do receptor AMPA. Figura representativa do western blot (cima); análise densitométrica para proteína de interesse/Actina (baixo). Teste Kruskal-Wallis, $p > 0,05$. Cabeça ELTE e ELTD $n=4$; cauda ELTE $n=6$ e cauda ELTD $n=4$.

A expressão da subunidade α – isoformas $\alpha 1$ (Figura 10A), $\alpha 2$ (Figura 10B), $\alpha 3$ (Figura 10C) - e FXD2 (Figura 10D) também foram quantificadas em pacientes ELTE e ELTD.

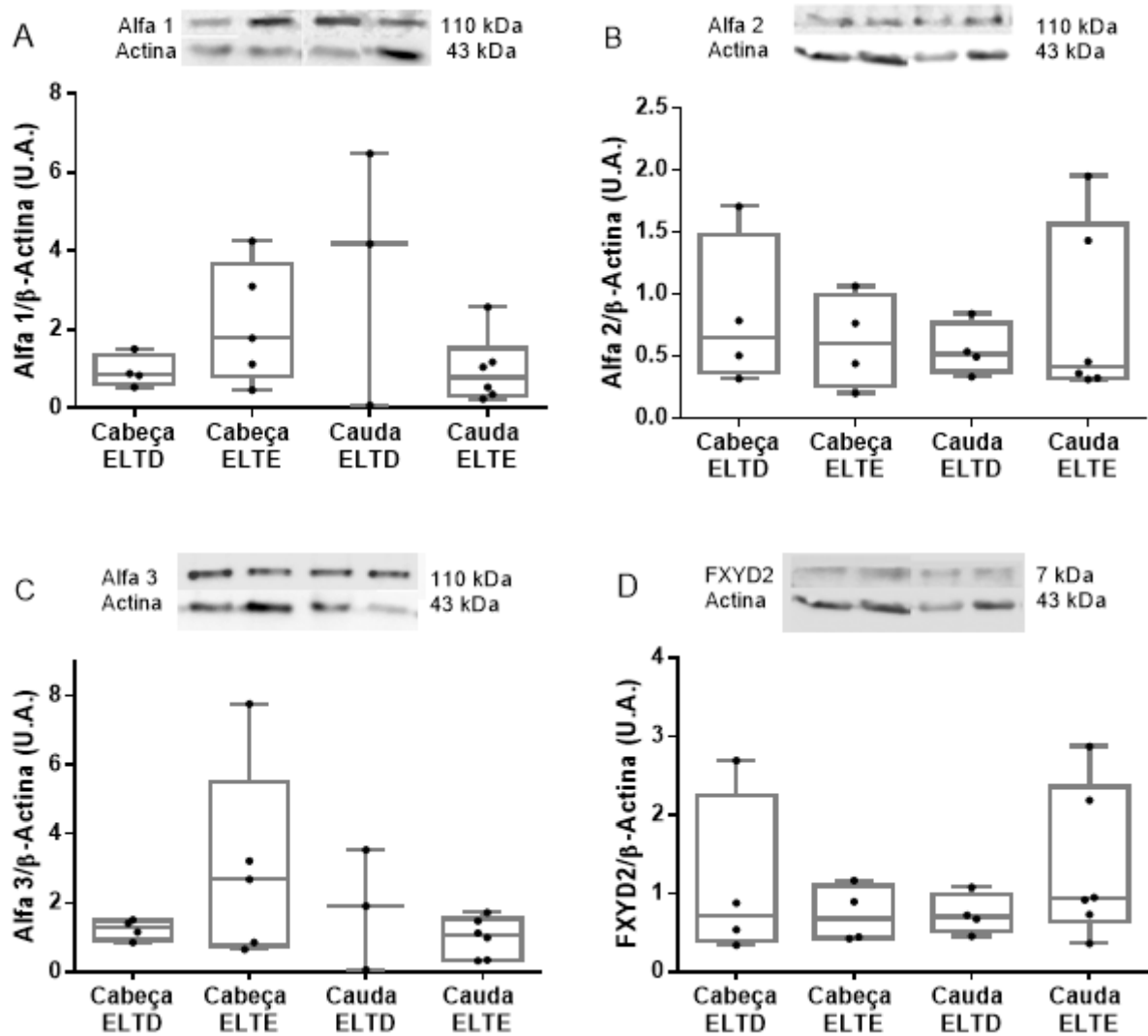


Figura 10. Expressão de subunidades da Na^+, K^+ ATPase. Figura representativa do western blot (cima); análise densitométrica para proteína de interesse/Actina (baixo). (A) isoformas $\alpha 1$; (B) isoformas $\alpha 2$; (C) Isoforma $\alpha 3$; (D) FXDY2. Teste Kruskal-Wallis, $p > 0,05$. Cabeça ELTE $n=4$; cauda ELTE $n=6$; cabeça ELTD $n=4$; cauda ELTD $n=4$ (B e D). Cabeça ELTE $n=5$; cauda ELTE $n=6$; cabeça ELTD $n=4$; cauda ELTD $n=3$ (A e C).

Além disso, foi feita a análise da expressão de proteínas da via apoptótica, sendo elas AIF (proteína da via intrínseca independente de caspases; Figura 11A), citocromo c (proteína da via intrínseca; Figura 11B), caspase 8 (via extrínseca; Figura 11C), caspase 3 (Figura 11D).

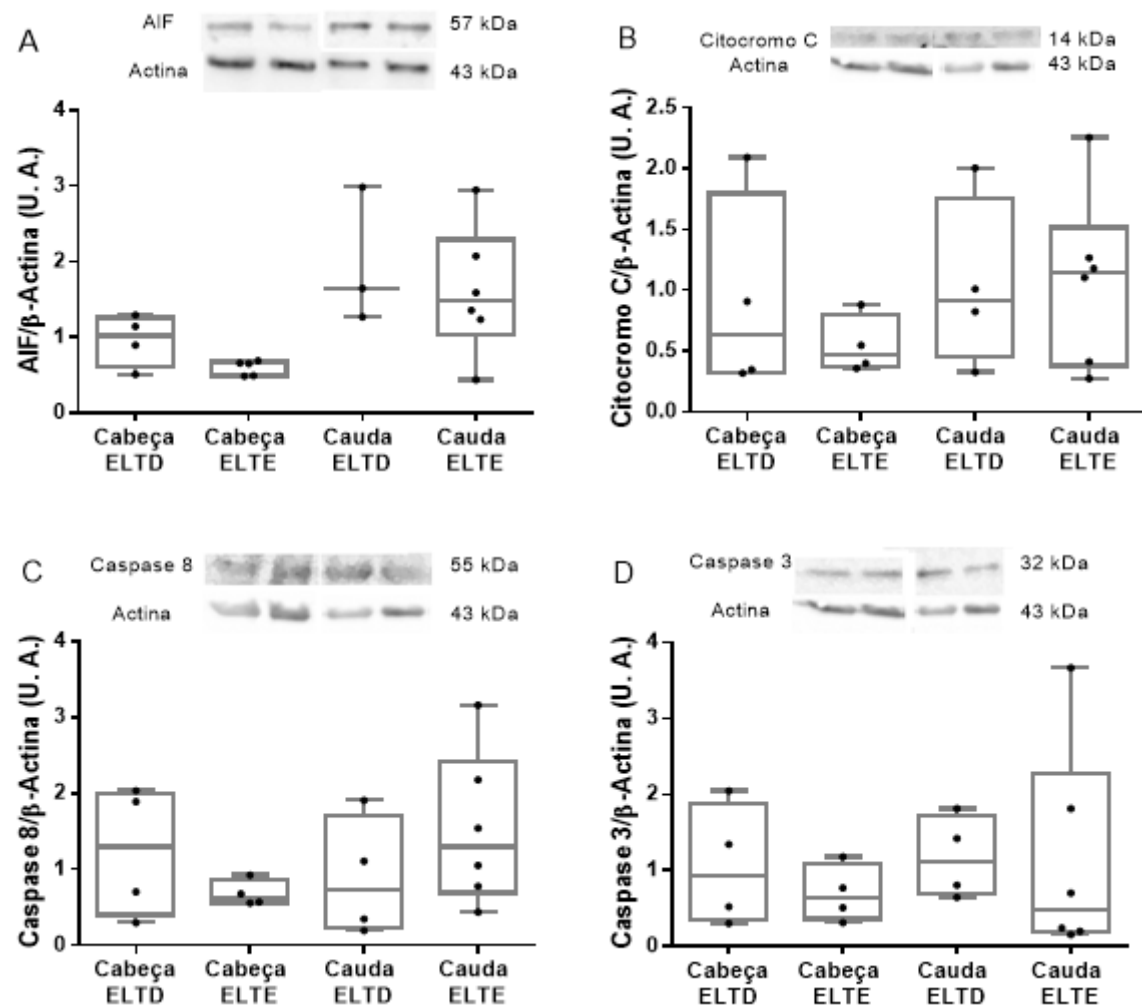


Figura 11. Expressão de proteínas da via de apoptose. Figura representativa do western blot (cima); análise densitométrica para proteína de interesse/Actina (baixo). (A) AIF (Cabeça ELTE n=5; cauda ELTE n=6; cabeça ELTD n=4; cauda ELTD n=3); (B) Citocromo c; (C) Caspase 8; (D) Caspase 3. Teste Kruskal-Wallis, $p > 0,05$. Cabeça ELTE n=4; cauda ELTE n=6; cabeça ELTD n=4; cauda ELTD n=4.

As proteínas analisadas apresentaram valores semelhantes na expressão entre os pacientes operados à esquerda e à direita, e ao comparar expressão em cabeça e cauda hipocampal (Tabela 5).

Tabela 5. Expressão das proteínas de interesse em pacientes ELTE e ELTD. Expressão em pacientes ELTE e ELTD nas regiões de cabeça e cauda hipocampais. Os valores aqui mostrados foram normalizados para β -actina e estão representados como mediana (Q1 [quartil 1; 25%]; Q3 [quartil 3; 75%]).

Proteína	ELTE		ELTD		Figura
	Cabeça	Cauda	Cabeça	Cauda	
GluR1	0,50 (Q1 0,24; Q3 1,00)	0,84 (Q1 0,40; Q3 1,35)	0,43 (Q1 0,32; Q3 0,58)	1,41 (Q1 0,67; Q3 2,13)	9
α1	1,78 (Q1 0,80; Q3 3,68)	0,79 (Q1 0,33; Q3 1,53)	0,86 (Q1 0,61; Q3 1,35)	4,18 (Q1 0,08; Q3 6,48)	10A
α2	0,60 (Q1 0,26; Q3 0,99)	0,41 (Q1 0,32; Q3 1,56)	0,65 (Q1 0,36; Q3 1,48)	0,51 (Q1 0,37; Q3 0,77)	10B
α3	2,68 (Q1 0,76; Q3 5,47)	1,06 (Q1 0,34; Q3 1,54)	1,28 (Q1 0,93; Q3 1,49)	1,91 (Q1 0,06; Q3 3,53)	10C
FXD2	0,67 (Q1 0,43; Q3 1,10)	0,93 (Q1 0,64; Q3 2,35)	0,71 (Q1 0,39; Q3 2,24)	0,70 (Q1 0,51; Q3 0,99)	10D
AIF	0,66 (Q1 0,49; Q3 0,68)	1,47 (Q1 1,04; Q3 2,98)	1,02 (Q1 0,61; Q3 1,26)	1,65 (Q1 1,27; Q3 2,29)	11A
Citocromo C	0,47 (Q1 0,37; Q3 0,80)	1,14 (Q1 0,38; Q3 1,51)	0,63 (Q1 0,33; Q3 1,80)	0,92 (Q1 0,45; Q3 1,76)	11B
Caspase 8	0,62 (Q1 0,56; Q3 0,86)	1,30 (Q1 0,69; Q3 2,42)	1,30 (Q1 0,40; Q3 2,00)	0,73 (Q1 0,23; Q3 1,71)	11C
Caspase 3	0,64 (Q1 0,36; Q3 1,08)	0,47 (Q1 0,19; Q3 2,28)	0,93 (Q1 0,36; Q3 1,87)	1,12 (Q1 0,69; Q3 1,72)	11D

Considerando as alterações moleculares, para este estudo foram selecionadas proteínas relacionadas à excitabilidade, excitotoxicidade e morte neuronal, as quais há evidências da relação destas e a ocorrência ou a predisposição às epilepsias.

Este estudo é pioneiro quanto à investigação de diferenças moleculares, em tecido hipocampal humano, considerando a lateralidade do início ictal (ELTD e ELTE) e diferentes regiões do hipocampo. De forma abrangente, a metodologia empregada indicou expressão semelhante de todas as proteínas nos grupos investigados.

Receptores AMPA são os receptores de glutamato ionotrópicos localizados na membrana pós-sináptica, de extrema relevância na geração e propagação de atividade epiléptica (Di Bonaventura *et al.*, 2017). Já foi mostrado um aumento da

expressão da subunidade GluR1 em hipocampo de pacientes epiléticos comparado com tecido de autópsias de pessoas sem condições neurológicas, o que pode alterar a neurotransmissão excitatória mediada por glutamato e contribuir para o processo de epileptogênese no hipocampo (Mathern *et al.*, 1998). Porém, ao comparar sua expressão em regiões hipocámpais de pacientes com início ictal à direita ou à esquerda observou-se expressão semelhante desta proteína, o que indicaria que não há maior susceptibilidade à excitabilidade ou à excitotoxicidade em um grupo específico, não decorrente da diferença na expressão desta subunidade dos canais AMPA.

Receptores AMPA podem ser internalizados em resposta a diversos estímulos extracelulares (Carroll *et al.*, 2001). A quantificação foi feita em preparação de extrato total e não preparação de membrana, sendo assim, é possível que haja diferença nos níveis do receptor AMPA entre os grupos quando se analisa somente o que está presente na membrana plasmática. Também seria interessante analisar a proporção da subunidade GluR1 em relação à GluR2 para investigar possíveis aumentos da subunidade GluR1 em relação à GluR2, o que permitiria maior entrada de Ca^{2+} na célula (Egbenya *et al.*, 2018).

No cérebro, a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase contribui para a manutenção do gradiente eletroquímico neuronal (Stahl e Harris, 1986). Consequentemente, mudanças na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase afetem diretamente também a atividade neuronal (Moseley *et al.*, 2007).

Embora Deprez *et al.* (2008) mostre que mutações na subunidade α_2 , que causam perda ou alteram função da enzima podem levar à epilepsia, nenhuma das subunidades α da Na^+ , K^+ -ATPase apresentaram diferença de expressão nos grupos analisados. Porém, há ainda a possibilidade da atividade da enzima ser diferente entre os grupos e regiões, uma vez que já foi visto disfunção em estudos com modelos de epilepsia em roedores (Schneider Oliveira *et al.*, 2004; Marquezan *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2017; Parreira *et al.*, 2018) e em tecido de foco ictal em humanos (Rapport *et al.*, 1975; Grisar e Delgado-Escueta, 1986).

Diversos estímulos podem induzir a internalização da Na^+ , K^+ -ATPase, como a ação da ouabaína, dopamina, hormônio paratireoidal, hipóxia e sepsia (Cherniavsky-Lev *et al.*, 2014). Como a quantificação foi feita em preparação de extrato total e não preparação de membrana, pode ainda ser que haja diferença nos

níveis das isoformas da subunidades α e de FXVD2 entre os grupos quando se analisa somente o que está de fato presente na membrana plasmática.

Pesquisas sobre o mecanismo pelo qual os neurônios morrem após lesões cerebrais decorrentes de crises epiléticas, identificaram o envolvimento da apoptose, uma forma de morte celular programada (Liou *et al.*, 2003).

Se tratando de proteínas envolvidas na apoptose, Chuang *et al.* (2007) mostrou em modelo de ratos de epilepsia um aumento na expressão de citocromo c quando comparada ao controle não epilético. Também o AIF mitocondrial de pacientes com ELT tem maiores níveis do que grupo controle não epilético (Schindler *et al.*, 2006). A caspase 8 ativa é encontrada em maiores níveis em tecido humano de pacientes de ELT quando comparado ao de pessoas não epiléticas (Yamamoto *et al.*, 2006). Henshall *et al.* (2000) mostra que há uma expressão maior de caspase 3 e caspase 3 clivada em pacientes de ELT comparado com tecido de indivíduos não epiléticos.

Tanto citocromo c quanto AIF são proteínas que se encontram na mitocôndria em condições normais e liberadas no citosol quando há estímulo apoptótico pela via intrínseca (Kong *et al.*, 2016). Considerando que fizemos quantificação das proteínas em extrato total, sem fracionamento subcelular para separar mitocôndria, citosol e núcleo, ainda há a possibilidade de que haja diferença nos níveis destas proteínas entre os grupos no citosol isoladamente, onde indicaria maior ativação da via intrínseca.

Como caspase 3 está relacionada tanto com a via intrínseca quanto com a via extrínseca (Lossi *et al.*, 2018), isto, somado com os resultados com caspase 8, citocromo c e AIF, podem indicar que as vias extrínseca e intrínseca não apresentam diferença em importância na morte celular entre pacientes ELTD e ELTE nem entre as regiões de cabeça e cauda hipocampal.

Este estudo é pioneiro quanto à avaliação de possíveis diferenças de expressão, em tecido hipocampal humano de pacientes ELTD e ELTE, de proteínas envolvidas em vias da apoptose e na excitabilidade neuronal. Também é pioneiro em mostrar que há expressão de FXVD2 em tecido hipocampal humano.

V.4) Análise da correlação

Foram analisados os coeficientes de correlação entre os dados de volume obtidos para cauda e cabeça hipocampal de pacientes operados à direita e à

esquerda com os dados de testes moleculares destes mesmos pacientes, sendo que então, só foram usados dados de pacientes em que obtivemos tanto dados para análise morfológica quanto molecular, o que reduziu nosso número amostral em relação ao que já havia sido feito até aqui.

Uma vez que não houve diferença nas expressões das proteínas analisadas entre pacientes operados à esquerda e à direita, a análise de correlação foi realizada agrupando ambos resultados para fortalecer o número amostral.

Não havia até o momento, dados na literatura da análise da correlação entre o dano hipocampal indicado pela redução de volume e a expressão de proteínas relacionadas à excitabilidade e morte neuronal na epilepsia do lobo temporal,

Grigorenko *et al.* (1997) demonstrou uma correlação negativa entre níveis de mRNA de GluR1 e duração da epilepsia, indicando uma mudança gradual com o tempo de epilepsia. Entretanto não há estudos correlacionando volume da regiões hipocampais e GluR1. Nossos resultados podem indicar que há, entre GluR1 e o volume de cabeça e cauda hipocampal (Figura 12), um índice de correlação negativo, o que indicaria uma maior presença de GluR1, quanto menor o hipocampo, que por sua vez teria uma maior probabilidade de formar o receptor AMPA GluR1/GluR1, permitindo maior influxo de cálcio e maior susceptibilidade de excitotoxicidade (Egbenya *et al.*, 2018), o que poderia explicar o volume menor de cabeça e cauda em pacientes com sua maior presença.

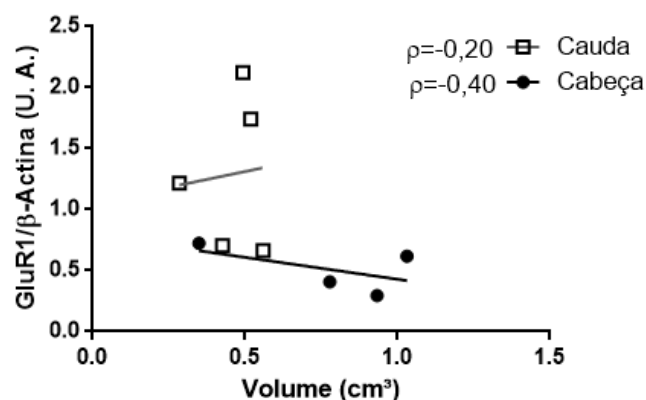


Figura 12. Correlação de volume hipocampal e expressão de subunidade GLUR1 de receptor AMPA. Correlação entre dados de expressão de GluR1 e volume de cabeça ($p=0,75$) e volume de cauda hipocampal ($p=0,78$). Coeficiente de correlação de Spearman (ρ). Cabeça $n=4$; cauda $n=5$.

Quanto à Na^+ , K^+ -ATPase, o índice de correlação indicou uma prevalência de relações negativas. O índice de correlação de $\alpha 1$ e $\alpha 3$ com volume de cabeça e

cauda hipocampal é negativo (Figura 13 A e C), indicando maior presença de $\alpha 1$ e $\alpha 3$ em hipocampos com maior volume. A direção do índice de correlação de $\alpha 2$ com volume hipocampal foi diferente para cauda e cabeça. Apresentando-se para cauda praticamente nulo (Figura 13B), pois o valor de r obtido foi muito próximo a zero. Já para a cabeça, obtivemos um índice de correlação negativo, indicando maior presença em tecidos com menor volume de cabeça hipocampal. A direção do índice de correlação também foi diferente para FXD2, (Figura 13D) apresentando-se negativo para cauda, mas positivo para cabeça.

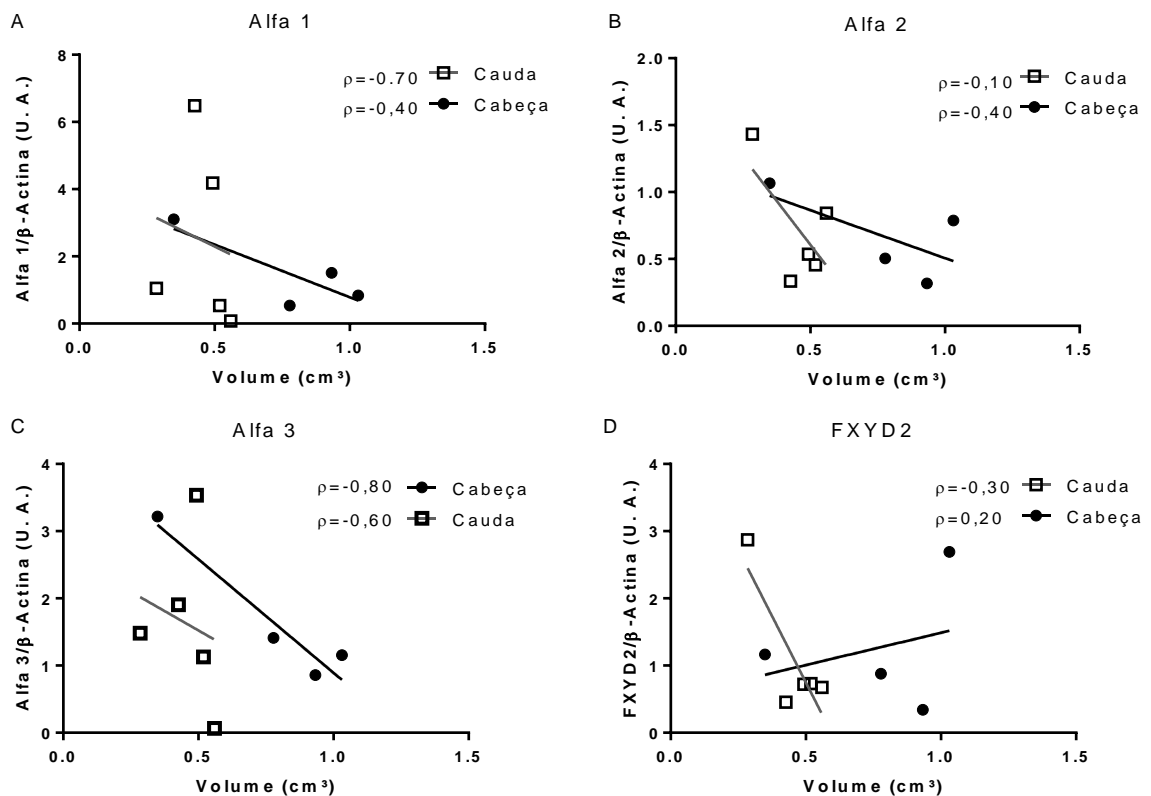


Figura 13. Correlação entre volume hipocampal e expressão da subunidade da Na⁺, K⁺-ATPase: (A) $\alpha 1$ ($p=0,75$ e $0,23$ para cabeça e cauda, respectivamente), (B) $\alpha 2$ ($p=0,75$ e $0,95$), (C) $\alpha 3$ ($p=0,33$ e $0,35$) e (D) FXD2 ($p=0,92$ e $0,68$). Coeficiente de correlação de Spearman (ρ). Cabeça $n=4$; cauda $n=5$.

Há indícios de que a Na⁺, K⁺-ATPase tem um papel em diversas desordens neurológicas, incluindo a epilepsia, o que a torna um potencial alvo para tratamento desta condição (Funck *et al.*, 2014),

A isoforma $\alpha 1$, que tem expressão ubíqua em células neurais e $\alpha 3$, que tem expressão em neurônios (Melone *et al.*, 2019), apresentaram correlação negativa

com o volume nas duas regiões hipocampais estudadas, o que pode indicar uma ação homogênea no hipocampo e coordenada destas isoformas nos neurônios, para o controle da excitabilidade neural.

A isoforma $\alpha 2$ está presente principalmente em astrócitos (Melone *et al.*, 2019), onde há a presença de transportadores de glutamato, que recaptam este neurotransmissor da fenda sináptica através da força motriz do gradiente eletroquímico de sódio e potássio (Frizzo, 2019). Já foi mostrada que há uma interação de receptores de glutamato com a subunidade $\alpha 2$ em astrócitos e pode-se sugerir que esta subunidade é mobilizada por glutamato em resposta a neurotransmissão excitatória aumentada (Cholet *et al.*, 2002). Sendo assim, a isoforma $\alpha 2$, que apresenta baixo índice de correlação com volume da região de cauda hipocampal, pode sugerir sua completa ineficiência no controle da excitabilidade nesta região de pacientes ELT, mesmo sendo importante para a manutenção das concentrações de Na e K intracelulares que podem ser alteradas pela recaptação de glutamato pelos astrócitos, em tecidos sem alterações neurológicas (Cholet *et al.*, 2002). Porém, na cabeça hipocampal esta correlação apresentou índice maior, indicando que pode existir uma possível importância dessa isoformas no controle da excitabilidade desta região, neste tecido já danificado pela epilepsia.

Para FXYD2 também houve uma diferença na direção do índice de correlação nas duas regiões hipocampais estudadas. Observou-se uma correlação positiva entre a expressão de FXYD2 e volume da cabeça hipocampal, o que poderia indicar uma maior translocação de FXYD2 para a membrana nos tecidos menos danificados, possivelmente em uma tentativa de regular a atividade da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase e conseqüentemente a excitabilidade, logo quando os danos se iniciam, uma vez que há dados na literatura que indicam que a atividade do transportador de glutamato GLAST/EAAT1 aparenta direcionar FXYD2 para a superfície celular, onde ela pode por vez modular a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, podendo levar a sua ativação em astrócitos humanos (Gegelashvili *et al.*, 2007). Enquanto isso, na cauda ocorre exatamente o oposto, sendo a FXYD2 mais presente em tecidos em que o volume é menor, sendo que já houve mais dano.

Os casos da subunidade α , $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, em cabeça e cauda em que o índice de correlação é negativa ou praticamente nula, não justifica o aumento da excitabilidade característica dos pacientes com epilepsia do lobo temporal,

decorrente na disfunção do controle iônico desta bomba. Além disso, a metodologia utilizada neste estudo quantifica a expressão e não investiga a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, não podendo desconsiderar que a atividade da enzima esteja alterada (Rapport *et al.*, 1975; Grisar e Delgado-Escueta, 1986). Outra possibilidade que poderia tornar o estudo mais específico, seria correlacionar o dano hipocampal, avaliado pela diminuição do volume, com a expressão destas proteínas na membrana plasmática, pois ter mais Na^+ , K^+ -ATPase em tecido mais danificado não significa que estas estejam em maior quantidade na membrana e que estas estejam mais ativas.

As proteínas envolvidas na apoptose, de ambas as vias, intrínseca e extrínseca, estão envolvidas com a esclerose hipocampal relacionada com epilepsia do lobo temporal (Teocchi e D'souza-Li, 2016). Assim como para a análise referente às proteínas da Na^+ , K^+ -ATPase, o índice de correlação indicou uma prevalência de relações negativas para as proteínas relacionadas à apoptose.

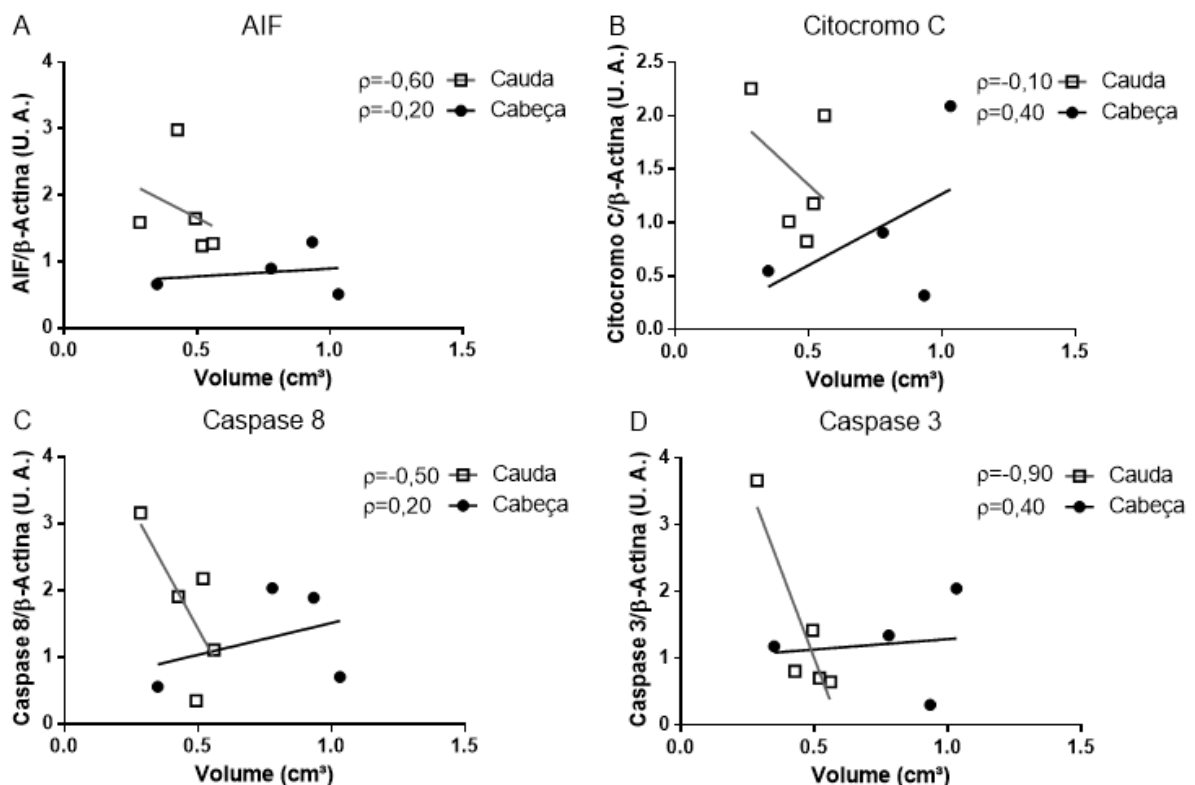


Figura 14. Correlação de volumetria hipocámpica e expressão de proteínas da via apoptótica. (A) AIF ($\rho = 0,92$ e $0,35$ para cabeça e cauda, respectivamente); (B) Citocromo C ($\rho = 0,75$ e $0,95$); (C) Caspase 8 ($\rho = 0,92$ e $0,45$); (D) Caspase 3 ($\rho = 0,75$ e $0,08$). Coeficiente de correlação de Spearman (ρ). Cabeça $n = 4$; cauda $n = 5$.

O índice de correlação para AIF foi negativo tanto para cabeça quanto para cauda (Figura 14A). Logo, indica que, em pacientes com hipocampo com menor volume, há maior presença de AIF, o que pode significar mais morte celular pela via de apoptose independente de caspase, especialmente na cauda hipocampal, uma vez que o índice para cabeça hipocampal foi menor.

O índice de correlação de citocromo c com volume de a cauda apresentou correlação próxima de 0, sendo a correlação praticamente nula. Enquanto isso, para cabeça hipocampal (Figura 14B) é positivo, mostrando maior presença em hipocampos de maiores volumes. Assim, nestes pacientes haveria mais morte celular por esta via em estágios iniciais em que não houve muito dano estrutural no hipocampo.

Para caspase 8 houve um comportamento diferencial entre as regiões hipocampais estudadas. A correlação entre volume da cauda hipocampal e caspase 8 apresenta um coeficiente negativo, indicando que há maior presença da proteína em caudas com volumes menores. Já a correlação com a cabeça hipocampal é positiva, sugerindo maior presença em tecidos com maior volume (Figura 14C). Estes resultados indicam que, na cabeça hipocampal, há mais morte celular pela via extrínseca em pacientes que apresentam esta região hipocampal já com um volume menor, pois caspase 8 está mais presente nestes pacientes. Já na cauda hipocampal, parece ocorrer o oposto, pois caspase 8 estaria mais expressa em pacientes com hipocampo com maiores volumes.

Correlação negativa entre expressão de caspase 3 e DNA mitocondrial foi mostrada (Feng *et al.*, 2018), indicando que há maiores níveis de caspase-3 quando há dano mitocondrial, mas não há estudo mostrando sua correlação com volume hipocampal em pacientes com epilepsia. O valor de r correlacionando caspase 3 e cauda hipocampal foi negativo (Figura 14D). Como a caspase 3 está envolvida nas vias intrínseca e extrínseca da apoptose, há a possibilidade de que qualquer uma das duas, ou as duas, estejam mais ativas na cauda hipocampal de pacientes com volume hipocampal menor. Já na cabeça, o índice de correlação foi positivo, mostrando então resultado semelhante ao da caspase 8, o que pode de fato indicar a ativação da via extrínseca na cabeça hipocampal de pacientes com poucos danos e na cauda hipocampal com pacientes com mais danos estruturais no hipocampo.

Utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman para analisar a intensidade e a direção da relação entre as variáveis, entretanto como o valor p é maior do que o

nível de significância de 0,05, mostra que há indícios, porém, as evidências são inconclusivas sobre a significância da associação entre as variáveis analisadas. A obtenção de tecido retirado de tratamento cirúrgico para a epilepsia e posterior análise em centros de pesquisa é um limitante neste tipo de estudo, uma avaliação com n amostral superior seria importante.

VI) CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi mostrado na década de 70 que as crises epiléticas podem levar à morte neuronal, sendo a apoptose um dos mecanismos possíveis. Além disso, pacientes de ELT tem grande risco de danos estruturais e cognitivos e muitos deles apresentam esclerose hipocampal. Entretanto, a eficácia do tratamento medicamentoso nem sempre é satisfatória, sendo necessário recorrer ao tratamento cirúrgico em muitos casos (Henshall, 2007; Zhang *et al.*, 2018).

Neste contexto, nossos resultados corroboram a literatura, indicando a presença de atrofia no hipocampo e suas regiões, cabeça e cauda, no lado afetado pela epilepsia quando comparado ao lado contralateral ao do início ictal, com a possibilidade de acometimento contralateral, como visto nos pacientes com epilepsia de início à esquerda

Além disso, as análises de correlação sugerem que alterações moleculares estão associadas à atrofia hipocampal. Os resultados com índices de correlação negativos podem indicar que vias apoptóticas poderiam estar mais ativas em hipocampos e suas regiões que já sofreram maior dano estrutural, que apresentam maior atrofia, podendo favorecer ainda mais o ciclo de morte neuronal. Ainda, as subunidades analisadas da Na⁺, K⁺-ATPase, podem estar aumentadas em hipocampos com maior dano estrutural em uma tentativa de diminuir a excitabilidade neuronal.

Quanto à análise molecular, o nosso trabalho avança na estratégia de desenho experimental, avaliando de forma mais seletiva as regiões e considerando a lateralidade do início ictal hipocampal. Entretanto, não foi possível observar diferenças na expressão das proteínas selecionadas e avaliadas envolvidas na apoptose ou na excitabilidade, comparando-se amostras de cabeça e de cauda ou de pacientes operados no hipocampo esquerdo ou direito. Sugerindo não haver diferenças para o uso das vias que utilizam estas proteínas para controlar a

excitabilidade ou a apoptose, ou seja, nenhuma especificidade molecular foi observada que poderia indicar alvos terapêuticos mais específicos a cada paciente, de acordo com sua lateralidade do foco da epilepsia.

De fato é crucial um melhor entendimento das alterações morfológicas e moleculares envolvidas na epilepsia para que se torne possível combater o surgimento e danos causados pelas crises epiléticas na ELT refratária, pois sabendo melhor como ocorre a morte celular durante as crises epiléticas, maior a chance de prevenir a morte e perdas funcionais eventuais. Uma possível diferença ao nível molecular entre pacientes ELTD e ELTE e entre as regiões do hipocampo poderia levar a alvos terapêuticos específicos para determinados pacientes ou regiões afetadas. Ainda há muito a ser investigado quanto a isso, pois outras proteínas envolvidas em vias de morte celular e parâmetros da ictogênese tem potencial de serem alvos terapêuticos.

VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, A. B. D. E. A definição de epilepsia em dez questões. 2020. Disponível em: < <https://www.epilepsiabrasil.org.br/definicoes-e-conceitos> >.

ALLONE, C. et al. Neuroimaging and cognitive functions in temporal lobe epilepsy: A review of the literature. **J Neurol Sci**, v. 381, p. 7-15, Oct 15 2017. ISSN 0022-510x.

ALVAREZ-PAGGI, D. et al. Multifunctional Cytochrome c: Learning New Tricks from an Old Dog. **Chemical reviews**, United States, v. 117, n. 21, p. 13382-13460, 2017. ISSN 1520-6890. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29027792> >.

AMINI, E. et al. A Molecular Approach to Epilepsy Management: from Current Therapeutic Methods to Preconditioning Efforts. **Mol Neurobiol**, v. 52, n. 1, p. 492-513, Aug 2015. ISSN 0893-7648.

ANDRADE-VALENÇA, L. P. A. et al. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, p. 31-36, 2006. ISSN 1676-2649. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-26492006000100007&nrm=iso >.

APERIA, A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. **J Intern Med**, v. 261, n. 1, p. 44-52, Jan 2007. ISSN 0954-6820 (Print) 0954-6820.

AWERBUCH, G.; OOMMEN, K. J.; SANDYK, R. Interictal temporal lobe epileptiform discharges and their relationship to secondarily generalized epilepsy. **Int J Neurosci**, v. 43, n. 1-2, p. 115-22, Nov 1988. ISSN 0020-7454 (Print)

0020-7454.

BABBITT, S. E. et al. Mitochondrial cytochrome c biogenesis: no longer an enigma. **Trends in biochemical sciences**, v. 40, n. 8, p. 446-455, 2015. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26073510> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4509832/> >.

BANO, D.; PREHN, J. H. M. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. **EBioMedicine**, v. 30, p. 29-37, Apr 2018. ISSN 2352-3964.

BARNHART, B. C.; ALAPPAT, E. C.; PETER, M. E. The CD95 type I/type II model. **Semin Immunol**, v. 15, n. 3, p. 185-93, Jun 2003. ISSN 1044-5323 (Print) 1044-5323.

BARTEL, F. et al. Regional analysis of volumes and reproducibilities of automatic and manual hippocampal segmentations. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0166785, 2017. ISSN 1932-6203.

BARUAH, J.; VASUDEVAN, A.; KÖHLING, R. Vascular Integrity and Signaling Determining Brain Development, Network Excitability, and Epileptogenesis. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 1583-1583, 2020. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32038280> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6987412/> >.

BEGHI, E. Addressing the burden of epilepsy: Many unmet needs. **Pharmacol Res**, v. 107, p. 79-84, May 2016. ISSN 1043-6618.

BENARROCH, E. E. Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. **Neurology**, v. 76, n. 3, p. 287-93, Jan 18 2011. ISSN 0028-3878.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-85, Apr 2010. ISSN 0013-9580.

BLANCO, G.; MERCER, R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **Am J Physiol**, v. 275, n. 5, p. F633-50, Nov 1998. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513.

BLISS, T. **The hippocampus book**. New York, NY, US: Oxford University Press, 2007. xx, 832-xx, 832 ISBN 0-195-10027-1 (Hardcover); 978-0-195-10027-3 (Hardcover).

BOCCARDI, M. et al. Training labels for hippocampal segmentation based on the EADC-ADNI harmonized hippocampal protocol. **Alzheimers Dement**, v. 11, n. 2, p. 175-83, Feb 2015. ISSN 1552-5260.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697.

BRANDT, C.; EBERT, U.; LOSCHER, W. Epilepsy induced by extended amygdala-kindling in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. **Epilepsy Res**, v. 62, n. 2-3, p. 135-56, Dec 2004. ISSN 0920-1211 (Print) 0920-1211.

CARROLL, R. C. et al. Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 5, p. 315-24, May 2001. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003x.

CARVALHO, T. B. O. et al. Seis anos de atendimento em trauma facial: análise epidemiológica de 355 casos. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 76, p. 565-574, 2010. ISSN 1808-8694. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-86942010000500006&nrm=iso >.

CAVARSAN, C. F. et al. Is Mossy Fiber Sprouting a Potential Therapeutic Target for Epilepsy? **Front Neurol**, v. 9, p. 1023, 2018. ISSN 1664-2295 (Print) 1664-2295.

CHANG, B.; XU, J. Deep brain stimulation for refractory temporal lobe epilepsy: a systematic review and meta-analysis with an emphasis on alleviation of seizure frequency outcome. **Childs Nerv Syst**, v. 34, n. 2, p. 321-327, Feb 2018. ISSN 0256-7040.

CHATZIKONSTANTINOOU, A. Epilepsy and the hippocampus. **Front Neurol Neurosci**, v. 34, p. 121-42, 2014. ISSN 0300-5186.

CHAUDHARY, K. et al. Does education play a role in language reorganization after surgery in drug refractory temporal lobe epilepsy: An fMRI based study? **Epilepsy Res**, v. 136, p. 88-96, Oct 2017. ISSN 0920-1211.

CHAVAKULA, V.; COSGROVE, G. R. Imaging for Epilepsy Surgery. **Semin Neurol**, v. 37, n. 5, p. 580-588, Oct 2017. ISSN 0271-8235.

CHEBAT, D. R. et al. Alterations in right posterior hippocampus in early blind individuals. **Neuroreport**, v. 18, n. 4, p. 329-33, Mar 5 2007. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965.

CHEN, K. H. et al. Hippocampal region-specific contributions to memory performance in normal elderly. **Brain Cogn**, v. 72, n. 3, p. 400-7, Apr 2010. ISSN 0278-2626.

CHERNIAVSKY-LEV, M. et al. Ouabain-induced internalization and lysosomal degradation of the Na⁺/K⁺-ATPase. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 2, p. 1049-1059, 2014. ISSN 1083-351X 0021-9258. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24275648> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3887173/> >.

CHOLET, N. et al. Similar perisynaptic glial localization for the Na⁺,K⁺-ATPase alpha 2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. **Cereb Cortex**, v. 12, n. 5, p. 515-25, May 2002. ISSN 1047-3211 (Print) 1047-3211.

CHUANG, Y. C. et al. Upregulation of nitric oxide synthase II contributes to apoptotic cell death in the hippocampal CA3 subfield via a cytochrome c/caspase-3 signaling cascade following induction of experimental temporal lobe status epilepticus in the rat. **Neuropharmacology**, England, v. 52, n. 5, p. 1263-1273, 2007. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17336342> >.

CLAPCOTE, S. J. et al. Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 33, p. 14085-14090, 2009. ISSN 1091-6490 0027-8424. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19666602> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2729024/> >.

COSENTINO, K.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Mitochondrial alterations in apoptosis. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 181, p. 62-75, 2014/07/01/ 2014. ISSN 0009-3084. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009308414000450> >.

CRAMBERT, G.; GEERING, K. FXYD Proteins: New Tissue-Specific Regulators of the Ubiquitous Na,K-ATPase. **Science's STKE**, v. 2003, n. 166, p. re1-re1, 2003. Disponível em: < <https://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/2003/166/re1.full.pdf> >.

DAS, J.; SINGH, R.; SHARMA, D. Antiepileptic effect of fisetin in iron-induced experimental model of traumatic epilepsy in rats in the light of electrophysiological, biochemical, and behavioral observations. **Nutr Neurosci**, v. 20, n. 4, p. 255-264, May 2017. ISSN 1028-415x.

DAUGHERTY, A. M. et al. A reliable and valid method for manual demarcation of hippocampal head, body, and tail. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 41, p. 115-122, 2015/04/01/ 2015. ISSN 0736-5748. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073657481500009X> >.

DE CURTIS, M.; GNATKOVSKY, V. Reevaluating the mechanisms of focal ictogenesis: The role of low-voltage fast activity. **Epilepsia**, v. 50, n. 12, p. 2514-25, Dec 2009. ISSN 0013-9580.

DE LORES ARNAIZ, G. R.; ORDIERES, M. G. L. Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity In Aging and Disease. **International journal of biomedical science : IJBS**, v. 10, n. 2, p. 85-102, 2014. ISSN 1550-9702 1555-2810. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25018677> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4092085/> >.

DEPREZ, L. et al. Epilepsy as part of the phenotype associated with ATP1A2 mutations. **Epilepsia**, United States, v. 49, n. 3, p. 500-508, 2008. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18028407> >.

DERICIOGLU, N. et al. Cell death and survival mechanisms are concomitantly active in the hippocampus of patients with mesial temporal sclerosis. **Neuroscience**, v. 237, p. 56-65, May 1 2013. ISSN 0306-4522.

DI BONAVENTURA, C. et al. AMPA receptors and perampanel behind selected epilepsies: current evidence and future perspectives. **Expert opinion on pharmacotherapy**, England, v. 18, n. 16, p. 1751-1764, 2017. ISSN 1744-7666. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29023170> >.

DIERING, G. H.; HUGANIR, R. L. The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. **Neuron**, v. 100, n. 2, p. 314-329, 2018. ISSN 1097-4199 0896-6273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30359599> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6214363/> >.

DUARTE, J. T. C. et al. The impact of epilepsy duration in a series of patients with mesial temporal lobe epilepsy due to unilateral hippocampal sclerosis. **Epilepsy research**, Netherlands, v. 147, p. 51-57, 2018. ISSN 1872-6844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30248630> >.

EGBENYA, D. L. et al. Changes in synaptic AMPA receptor concentration and composition in chronic temporal lobe epilepsy. **Molecular and cellular neurosciences**, United States, v. 92, p. 93-103, 2018. ISSN 1095-9327. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30064010> >.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun 2007. ISSN 0192-6233 (Print) 0192-6233.

FAKHOURY, T.; ABOU-KHALIL, B.; PEGUERO, E. Differentiating clinical features of right and left temporal lobe seizures. **Epilepsia**, v. 35, n. 5, p. 1038-44, Sep-Oct 1994. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, Jan 14 2010. ISSN 0896-6273.

FENG, J.; FENG, L.; ZHANG, G. Mitochondrial damage in hippocampal neurons of rats with epileptic protein expression of Fas and caspase-3. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 16, n. 3, p. 2483-2489, 2018. ISSN 1792-0981 1792-1015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30210599> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6122536/> >.

FISHER, R. S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-82, Apr 2014. ISSN 0013-9580.

FISHER, R. S. et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522-530, 2017. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/epi.13670> >.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-2, Apr 2005. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580.

FOGWE, L. A.; MESFIN, F. B. Neuroanatomy, Hippocampus. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC., 2019.

FRICKER, M. et al. Neuronal Cell Death. **Physiol Rev**, v. 98, n. 2, p. 813-880, Apr 1 2018. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333.

FRIZZO, M. E. The Effect of Glutamatergic Modulators on Extracellular Glutamate: How Does this Information Contribute to the Discovery of Novel Antidepressants? **Current therapeutic research, clinical and experimental**, v. 91, p. 25-32, 2019. ISSN 0011-393X 1879-0313. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31871505> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6911922/> >.

FUNCK, V. R. et al. Long-term decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. **Epilepsy Research**, v. 108, n. 10, p. 1705-1710, 2014/12/01/ 2014. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920121114002587> >.

GALLO-OLLER, G.; ORDOÑEZ, R.; DOTOR, J. A new background subtraction method for Western blot densitometry band quantification through image analysis software. **Journal of Immunological Methods**, v. 457, p. 1-5, 2018/06/01/ 2018. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175918300371> >.

GEERING, K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 290, n. 2, p. F241-50, Feb 2006. ISSN 1931-857X (Print) 1522-1466.

GEGELASHVILI, M. et al. Glutamate transporter GLAST/EAAT1 directs cell surface expression of FXYD2/γ subunit of Na, K-ATPase in human fetal astrocytes. **Neurochemistry International**, v. 50, n. 7, p. 916-920, 2007/06/01/ 2007. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018607000216> >.

GRIGORENKO, E. et al. Changes in glutamate receptor subunit composition in hippocampus and cortex in patients with refractory epilepsy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 153, n. 1, p. 35-45, 1997. ISSN 0022-510X. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(97\)00180-9](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(97)00180-9) >. Acesso em: 2020/01/31.

GRISAR, T.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Astroglial contribution in human temporal lobe epilepsy: K⁺ activation of Na⁺,K⁺-ATPase in bulk isolated glial cells and synaptosomes. **Brain Res**, v. 364, n. 1, p. 1-11, Jan 29 1986. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993.

HACKERT, V. H. et al. Hippocampal head size associated with verbal memory performance in nondemented elderly. **Neuroimage**, v. 17, n. 3, p. 1365-72, Nov 2002. ISSN 1053-8119 (Print) 1053-8119.

HAMANDI, K. Starting antiepileptic drug treatment. In: STAPLEY, F. J. R.-G. H. B. (Ed.). **A practical guide do epilepsy**, 2017. cap. 26,

HELSETH, A. R. et al. Novel E815K knock-in mouse model of alternating hemiplegia of childhood. **Neurobiol Dis**, v. 119, p. 100-112, Nov 2018. ISSN 0969-9961.

HENSHALL, D. C. Apoptosis signalling pathways in seizure-induced neuronal death and epilepsy. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 2, p. 421-423, 2007. Disponível em: < <http://www.biochemsoctrans.org/content/ppbiost/35/2/421.full.pdf> >.

HENSHALL, D. C. et al. Alterations in bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy. **Neurology**, v. 55, n. 2, p. 250-7, Jul 25 2000. ISSN 0028-3878 (Print) 0028-3878.

HENSHALL, D. C.; MURPHY, B. M. Modulators of neuronal cell death in epilepsy. **Curr Opin Pharmacol**, v. 8, n. 1, p. 75-81, Feb 2008. ISSN 1471-4892 (Print) 1471-4892.

HENSHALL, D. C.; SIMON, R. P. Epilepsy and Apoptosis Pathways. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 25, n. 12, p. 1557-1572, 2005. Disponível em: < <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1038/sj.jcbfm.9600149> >.

HOYT, A. T.; SMITH, K. A. Selective Amygdalohippocampectomy. **Neurosurg Clin N Am**, v. 27, n. 1, p. 1-17, Jan 2016. ISSN 1042-3680.

HUNANYAN, A. S. et al. Mechanisms of increased hippocampal excitability in the Mash1^{+/-} mouse model of Na⁺/K⁺-ATPase dysfunction. **Epilepsia**, v. 59, n. 7, p. 1455-1468, 2018. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/epi.14441> >.

JOHNSON, E. L. Seizures and Epilepsy. **Med Clin North Am**, v. 103, n. 2, p. 309-324, Mar 2019. ISSN 0025-7125.

JULIEN, O.; WELLS, J. A. Caspases and their substrates. **Cell Death Differ**, v. 24, n. 8, p. 1380-1389, Aug 2017. ISSN 1350-9047 (Print) 1350-9047.

KASSED, C. A. et al. Injury-induced NF-kappaB activation in the hippocampus: implications for neuronal survival. **Faseb j**, v. 18, n. 6, p. 723-4, Apr 2004. ISSN 0892-6638.

KINOSHITA, P. F. et al. The Influence of Na(+), K(+)-ATPase on Glutamate Signaling in Neurodegenerative Diseases and Senescence. **Frontiers in physiology**, v. 7, p. 195-195, 2016. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27313535> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4890531/> >.

KIVISAARI, S. L.; PROBST, A.; TAYLOR, K. I. The Perirhinal, Entorhinal, and Parahippocampal Cortices and Hippocampus: An Overview of Functional Anatomy and Protocol for Their Segmentation in MR Images. In: ULMER, S. e JANSEN, O. (Ed.). **fMRI: Basics and Clinical Applications**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p.239-267. ISBN 978-3-642-34342-1.

KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Curr Biol**, v. 25, n. 23, p. R1116-21, Dec 7 2015. ISSN 0960-9822.

KOHL, M. M. et al. Hemisphere-specific optogenetic stimulation reveals left-right asymmetry of hippocampal plasticity. **Nature Neuroscience**, v. 14, p. 1413, 09/25/online 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nn.2915> >.

KONG, D. et al. Cytoprotective Effects of Oleanolic Acid in Human Umbilical Vascular Endothelial Cells is Mediated Via UCP2/ROS/Cytochrome C/AIF Pathway. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 67, n. 4, p. 344-50, Apr 2016. ISSN 0160-2446.

KONKIEWITZ, E.; JUNIOR, F. They are not only seizures: cognition, emotion and behavior in the mesial temporal epilepsy. **Neurociencias Ed Atlantica**, v. 12, p. 33, 01/01 2016.

LI, Q. et al. Alterations of apoptosis and autophagy in developing brain of rats with epilepsy: Changes in LC3, P62, Beclin-1 and Bcl-2 levels. **Neurosci Res**, v. 130, p. 47-55, May 2018. ISSN 0168-0102.

LIOU, A. K. et al. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. **Prog Neurobiol**, v. 69, n. 2, p. 103-42, Feb 2003. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082.

LIU, J.; LILLY, M. N.; SHAPIRO, J. I. Targeting Na/K-ATPase Signaling: A New Approach to Control Oxidative Stress. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 3, p. 359-364, 2018. ISSN 1873-4286 1381-6128. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29318961> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6052765/> >.

LIU, X. et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, United States, v. 86, n. 1, p. 147-157, 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8689682> >.

LOMBARD, C.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. Targeting cannabinoid receptors to treat leukemia: role of cross-talk between extrinsic and intrinsic pathways in Delta9-tetrahydrocannabinol (THC)-induced apoptosis of Jurkat cells. **Leuk Res**, v. 29, n. 8, p. 915-22, Aug 2005. ISSN 0145-2126 (Print) 0145-2126.

LORENTE DE NÓ, R. **Studies on the structure of the cerebral cortex. II, II**. Leipzig: Johann Ambrosius Barth, 1934.

LORIGADOS, L. et al. Excitotoxicity and neuronal death in epilepsy. **Biotechnología Aplicada**, v. 30, p. 9-16, 2013. ISSN 1027-2852. Disponível em: < http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522013000100002&nrm=iso >.

LOSSI, L.; CASTAGNA, C.; MERIGHI, A. Caspase-3 Mediated Cell Death in the Normal Development of the Mammalian Cerebellum. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 12, p. 3999, 2018. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30545052> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6321612/> >.

LU, W. et al. Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. **Neuron**, v. 62, n. 2, p. 254-68, Apr 30 2009. ISSN 0896-6273.

MARQUEZAN, B. P. et al. Pentylentetrazol-induced seizures are associated with Na⁺,K⁺-ATPase activity decrease and alpha subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex. **Epilepsy Research**, v. 105, n. 3, p. 396-400, 2013/08/01/ 2013. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920121113000922> >.

MATHERN, G. W. et al. Increased hippocampal AMPA and NMDA receptor subunit immunoreactivity in temporal lobe epilepsy patients. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, England, v. 57, n. 6, p. 615-634, 1998. ISSN 0022-3069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630240> >.

MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **J Neurosci**, v. 14, n. 6, p. 3413-25, Jun 1994. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of nutrition**, United States, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S-15S, 2000. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736372> >.

MELONE, M. et al. Heterogeneity of Astrocytic and Neuronal GLT-1 at Cortical Excitatory Synapses, as Revealed by its Colocalization With Na⁺/K⁺-ATPase alpha Isoforms. **Cereb Cortex**, v. 29, n. 8, p. 3331-3350, Jul 22 2019. ISSN 1047-3211.

MIDDLEBROOKS, E. H.; VER HOEF, L.; SZAFLARSKI, J. P. Neuroimaging in Epilepsy. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 17, n. 4, p. 32, Apr 2017. ISSN 1528-4042.

MOSELEY, A. E. et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **J Neurosci**, v. 27, n. 3, p. 616-26, Jan 17 2007. ISSN 0270-6474.

MOSER, M. B.; MOSER, E. I. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus**, v. 8, n. 6, p. 608-19, 1998. ISSN 1050-9631 (Print) 1050-9631.

NADLER, J. V.; PERRY, B. W.; COTMAN, C. W. Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. **Brain Res**, v. 182, n. 1, p. 1-9, Jan 20 1980. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Res**, v. 34, n. 1, p. 171-5, Nov 1971. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 460, n. 1, p. 72-81, Apr 24 2015. ISSN 0006-291x.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 7, p. 552-65, Jul 2003. ISSN 1471-0072 (Print)

1471-0072.

OW, Y.-L. P. et al. Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nature reviews. Molecular cell biology**, England, v. 9, n. 7, p. 532-542, 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568041> >.

PANDIS, C. et al. Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. **Neuroscience**, v. 140, n. 1, p. 163-75, Jun 19 2006. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522.

PARREIRA, G. M. et al. Oxidative stress and Na,K-ATPase activity differential regulation in brainstem and forebrain of Wistar Audiogenic rats may lead to increased seizure susceptibility. **Brain Res**, v. 1679, p. 171-178, Jan 15 2018. ISSN 0006-8993.

PINTON, P. et al. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6407-6418, 2008. ISSN 1476-5594 0950-9232. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18955969> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2844952/> >.

RAPPORT, R. L., II et al. Human Epileptic Brain: Na, K ATPase Activity and Phenytoin Concentrations. **Archives of Neurology**, v. 32, n. 8, p. 549-554, 1975. ISSN 0003-9942. Disponível em: < <https://doi.org/10.1001/archneur.1975.00490500069008> >. Acesso em: 11/17/2019.

RHO, J. M.; WHITE, H. S. Brief history of anti-seizure drug development. **Epilepsia Open**, v. 3, n. Suppl Suppl 2, p. 114-119, Dec 2018. ISSN 2470-9239 (Print) 2470-9239.

ROGAWSKI, M. A. AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 127, n. s197, p. 9-18, 2013. ISSN 0001-6314. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ane.12099> >.

SADEGHI, L. et al. Hippocampal asymmetry: differences in the left and right hippocampus proteome in the rat model of temporal lobe epilepsy. **J Proteomics**, v. 154, p. 22-29, Feb 10 2017. ISSN 1874-3919.

SCHALLER, K.; CABRILO, I. Anterior temporal lobectomy. **Acta Neurochirurgica**, v. 158, n. 1, p. 161-166, 2016/01/01 2016. ISSN 0942-0940. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00701-015-2640-0> >.

SCHEFFER, I. E. et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 512-521, Apr 2017. ISSN 0013-9580.

SCHINDLER, C. K. et al. Caspase-3 cleavage and nuclear localization of caspase-activated DNase in human temporal lobe epilepsy. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 26, n. 4, p. 583-9, Apr 2006. ISSN 0271-678X (Print) 0271-678x.

SCHNEIDER OLIVEIRA, M. et al. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. **Neuroscience**, v. 128, n. 4, p. 721-8, 2004. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522.

SCHULTZ, C.; ENGELHARDT, M. Anatomy of the hippocampal formation. **Front Neurol Neurosci**, v. 34, p. 6-17, 2014. ISSN 0300-5186.

SHEKH-AHMAD, T. et al. Reactive oxygen species in status epilepticus. **Epilepsy Behav**, p. 106410, Aug 1 2019. ISSN 1525-5050.

SHIMBO, A. et al. Mice lacking hippocampal left-right asymmetry show non-spatial learning deficits. **Behav Brain Res**, v. 336, p. 156-165, Jan 15 2018. ISSN 0166-4328.

SHIPTON, O. A. et al. Left-right dissociation of hippocampal memory processes in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 42, p. 15238-43, Oct 21 2014. ISSN 0027-8424.

SILVA, A. V. D.; CABRAL, F. R. Ictogênese, epileptogênese e mecanismo de ação das drogas na profilaxia e tratamento da epilepsia. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 14, p. 39-45, 2008. ISSN 1676-2649. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-26492008000600007&nrm=iso >.

SLOVITER, R. S. Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. **Hippocampus**, v. 1, n. 1, p. 31-40, Jan 1991. ISSN 1050-9631 (Print) 1050-9631.

SONGANE, M.; KHAIR, M.; SALEH, M. An updated view on the functions of caspases in inflammation and immunity. **Semin Cell Dev Biol**, v. 82, p. 137-149, Oct 2018. ISSN 1084-9521.

SPENCER, D.; BURCHIEL, K. Selective amygdalohippocampectomy. **Epilepsy Res Treat**, v. 2012, p. 382095, 2012. ISSN 2090-1348.

STAHL, W. L.; HARRIS, W. E. Na⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. **Adv Neurol**, v. 44, p. 681-93, 1986. ISSN 0091-3952 (Print)

0091-3952.

STEINHOFF, B. J.; STAACK, A. M. Is there a place for surgical treatment of nonpharmacoresistant epilepsy? **Epilepsy & Behavior**, v. 91, p. 4-8, 2019. ISSN 1525-5050. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.05.025> >. Acesso em: 2019/07/25.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondrial regulation of cell death. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 9, p. a008706, 2013. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24003207>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3753705/> >.

TAMMINGA, C. A. et al. Glutamate dysfunction in hippocampus: relevance of dentate gyrus and CA3 signaling. **Schizophrenia bulletin**, v. 38, n. 5, p. 927-935, 2012. ISSN 1745-1701 0586-7614. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22532703>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3446225/> >.

TEOCCHI, M. A.; D'SOUZA-LI, L. Apoptosis through Death Receptors in Temporal Lobe Epilepsy-Associated Hippocampal Sclerosis. **Mediators of inflammation**, v. 2016, p. 8290562-8290562, 2016. ISSN 1466-1861 0962-9351. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27006531>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4781997/> >.

THURMAN, D. J. et al. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. **Epilepsia**, v. 52, n. s7, p. 2-26, 2011. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1528-1167.2011.03121.x> >.

VENTÉO, S. et al. Fxyd2 regulates A δ - and C-fiber mechanosensitivity and is required for the maintenance of neuropathic pain. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36407, 2016/11/02 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/srep36407> >.

WALDBAUM, S.; PATEL, M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 88, n. 1, p. 23-45, Jan 2010. ISSN 0920-1211.

WALKER, M. C. Hippocampal Sclerosis: Causes and Prevention. **Semin Neurol**, v. 35, n. 3, p. 193-200, Jun 2015. ISSN 0271-8235.

WANG, F. et al. FXD2, a γ subunit of Na⁺, K⁺-ATPase, maintains persistent mechanical allodynia induced by inflammation. **Cell research**, v. 25, n. 3, p. 318-334, 2015. ISSN 1748-7838 1001-0602. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25633594>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4349241/> >.

WHO, W. H. O. Epilepsy. 2019. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy> >. Acesso em: 11/07/19.

WU, Y. et al. Target-cell-specific left-right asymmetry of NMDA receptor content in schaffer collateral synapses in epsilon1/NR2A knock-out mice. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 40, p. 9213-9226, 2005. ISSN 1529-2401 0270-6474. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16207881> >.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6725769/> >.

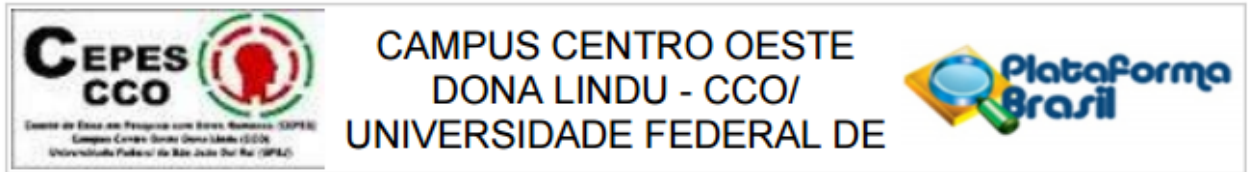
YAMAMOTO, A. et al. Evidence of tumor necrosis factor receptor 1 signaling in human temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol**, v. 202, n. 2, p. 410-20, Dec 2006. ISSN 0014-4886 (Print) 0014-4886.

ZHANG, H. et al. Ectopic expression of Miro 1 ameliorates seizures and inhibits hippocampal neurodegeneration in a mouse model of pilocarpine epilepsy. **Biochem Cell Biol**, v. 96, n. 4, p. 468-474, Aug 2018. ISSN 0829-8211.

ZHIVOTOVSKY, B. et al. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, n. 7, p. 644-651, 1999/07/01 1999. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400536> >.

ZHOU, Z. et al. Mitochondrial Metabolism in Major Neurological Diseases. v. 7, n. 12, Nov 23 2018. ISSN 2073-4409 (Print) 2073-4409.

Anexo 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA CORRELAÇÃO MORFOFUNCIONAL E MOLECULAR DO HIPOCAMPO DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL SUBMETIDOS À TRATAMENTO CIRÚRGICO

Pesquisador: Luciana Estefani Drumond de Carvalho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 54549816.0.0000.5545

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal de São João Del Rei - C. C. Oeste Dona

Patrocinador Principal: Universidade Federal de São João Del Rei-UFSJ/MG

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.578.718



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA CORRELAÇÃO MORFOFUNCIONAL E MOLECULAR DO HIPOCAMPO DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL SUBMETIDOS À TRATAMENTO CIRÚRGICO

Pesquisador: Luciana Estefani Drumond de Carvalho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54549816.0.3001.5125

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal de São João Del Rei - C. C. Oeste Dona

Patrocinador Principal: Universidade Federal de São João Del Rei-UFSJ/MG

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.626.155