

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Patologia

**AVALIAÇÃO DA ESCLEROSE HIPOCAMPAL E DE ASPECTOS INFLAMATÓRIOS,  
APOPTÓTICOS E COGNITIVOS EM PACIENTES PORTADORES DE EPILEPSIA DO  
LOBO TEMPORAL**

ELIANA CRISTINA DE BRITO TOSCANO

Belo Horizonte

2019

ELIANA CRISTINA DE BRITO TOSCANO

**AVALIAÇÃO DA ESCLEROSE HIPOCAMPAL E DE ASPECTOS INFLAMATÓRIOS,  
APOPTÓTICOS E COGNITIVOS EM PACIENTES PORTADORES DE EPILEPSIA DO  
LOBO TEMPORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Patologia Investigativa.

**Orientadora:** Profa. Dra. Milene Alvarenga Rachid

**Coorientadores:** Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira e Dra. Érica Leandro Marciano Vieira

Belo Horizonte

2019

- 043 Toscano, Eliana Cristina de Brito.  
Avaliação da esclerose hipocampal e de aspectos inflamatórios, apoptóticos e cognitivos em pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal [manuscrito] / Eliana Cristina de Brito Toscano. – 2019.  
110 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Milene Alvarenga Rachid. Co-orientadores: Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira e Dra. Érica Leandro Marciano Vieira.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia.
1. Patologia. 2. Epilepsia do Lobo Temporal. 3. Esclerose. 4. Hipocampo. 5. Gliose. 6. Apoptose. 7. Memória. I. Rachid, Milene Alvarenga. II. Teixeira, Antônio Lúcio. III. Vieira, Érica Leandro Marciano. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina. V. Título.

CDU: 616



Programa de  
Pós-Graduação  
em Patologia

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**"AVALIAÇÃO DA ESCLEROSE HIPOCAMPAL E DE ASPECTOS  
INFLAMATÓRIOS, APOPTÓTICOS E COGNITIVOS EM PACIENTES  
PORTADORES DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL"**

**ELIANA CRISTINA DE BRITO  
TOSCANO**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 05 de novembro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira – ICB/UFMG

Prof. Camila Megale de Almeida Leite – ICB/UFMG

Prof. Karen Cecília de Lima Torres Navarro - UNIFENAS

Prof. Vitor Márcio Ribeiro – PUC/MINAS

Prof. Milene Alvarenga Rachid – ICB/UFMG  
ORIENTADORA

Belo Horizonte, 05 de novembro de 2019.

Faculdade de Medicina - UFMG  
Campus Saúde  
Centro de Pós-Graduação  
Av. Professor Alfredo Balena, 190 - 5º andar  
Centro - Cep: 301300100  
Belo Horizonte - MG  
Tel: 3409-9640 - 3403-9641  
cnp.ufo-patol@em.ufmg.br

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG  
Campus Pampulha  
Departamento de Patologia Geral  
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627  
Pampulha - Cep: 31270-901  
Belo Horizonte - MG  
Tel: 3409-2378  
dmat@icb.ufmg.br

## ATA DA DEFESA DA TESE DA ALUNA

### ELIANA CRISTINA DE BRITO TOSCANO

Realizou-se, no dia 05 de novembro de 2019, às 14 horas, Bloco C-3º andar – sala 241 - ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Tese, intitulada “*AVALIAÇÃO DA ESCLEROSE HIPOCAMPAL E DE ASPECTOS INFLAMATÓRIOS, APOPTÓTICOS E COGNITIVOS EM PACIENTES PORTADORES DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL*”, apresentada por ELIANA CRISTINA DE BRITO TOSCANO, número de registro 2016665119, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Profª. Milene Alvarenga Rachid - Orientadora (UFMG), Prof. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira (UFMG), Profª. Camila Megale de Almeida Leite (UFMG), Profª. Karen Cecília de Lima Torres Navarro (UNIFENAS), Prof. Vitor Márcio Ribeiro (PUC MINAS).

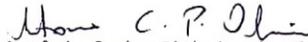
A Comissão considerou a Tese:

- Aprovada  
 Reprovada

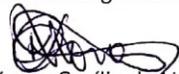
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

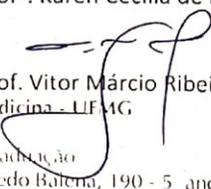
Belo Horizonte, 05 de novembro de 2019.

  
Profª. Dra. Milene Alvarenga Rachid – Orientadora

  
Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

  
Profª. Camila Megale de Almeida Leite

  
Profª. Karen Cecília de Lima Torres Navarro

  
Prof. Vitor Márcio Ribeiro

Faculdade de Medicina - UFMG  
Campus Saúde  
Centro de Pós-Graduação  
Av. Professor Alfredo Balena, 190 - 5º andar  
Centro - Cep: 301300100  
Belo Horizonte - MG  
Tel: 3409-9640 - 3403-9641  
cpg.ppg.patol@gmail.com

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG  
Campus Pampulha  
Departamento de Patologia Geral  
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627  
Pampulha - Cep: 31270-901  
Belo Horizonte - MG  
Tel: 3409-2878  
dpat@icb.ufmg.br

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, tendo a colaboração dos Laboratórios de Interdisciplinar de Investigação Médica e Laboratório de Protozooses, localizados, respectivamente na Faculdade de Medicina e no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A coleta das amostras e dos dados clínicos foi realizada no Hospital das Clínicas e no Hospital Felício Rocho, ambos localizados em Belo Horizonte. As amostras controles foram obtidas em parceria com o *Biobank for Aging Studies* da Universidade de São Paulo. O trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## AGRADECIMENTOS

O Doutorado me trouxe uma série de aprendizados profissionais e pessoais. Por um lado, algumas angústias, desilusões e transtorno de ansiedade generalizada. Por outro lado, amigos, amadurecimento e uma capacidade, até então desconhecida, de ser resiliente. Na verdade, resiliência é a melhor palavra para definir esses quase quatro anos. Resiliência quando um experimento dava errado, quando uma amostra era perdida, quando eu me sentia completamente sozinha neste meio acadêmico, que, apesar de coletivo, por vezes, é bastante solitário. Ao escrever essas linhas, sinto que eu não poderia estar fazendo outra coisa e que esse processo foi essencial para a construção de quem me tornei e pretendo me tornar. Entre ônus e bônus, transborda um sentimento de gratidão:

À Deus, por me conduzir em cada detalhe e me acalantar nas situações adversas.

A minha mãe, Sirlene, por me transmitir a força do amor e da abdicção durante toda minha vida.

Ao meu pai, Eduardo, por me ensinar, pelo exemplo, a integridade e generosidade em seus sentidos mais genuínos e incondicionais.

Ao meu irmão, Vinícius, por ser presente em cada momento, principalmente nos que eu preciso de uma verdade que dói.

Ao Gustavo, meu companheiro na vida, por enfrentar mais essa batalha comigo, com amor e paciência (e sim, por me ajudar na produção das pranchas histológicas).

Às espiritualidades amigas, sempre presentes, vovô Eduardo, vovó Neli e tia Sirlei, por estarem ao meu lado emitindo boas energias.

À Milene, por me acolher há quase seis anos e por me proporcionar tantas oportunidades e aprendizados. Sobretudo, por ser fundamental em minha formação profissional e humana, desde a graduação.

Ao Antônio, pelos infinitos ensinamentos, conselhos e paciência em construir cada parte desse trabalho comigo. O que seria da genialidade sem a generosidade?

À Érica, por confiar a mim várias ideias e ideais e por “colocar a mão na massa” (grata companhia nos feriados e sábados até meia noite, fazendo experimentos), sempre com um sorriso gentil e palavras positivas; e também pela amizade tão genuína.

Aos membros da banca, Drs. Antônio Oliveira, Camila Leite, Karen Navarro, Vítor Ribeiro, Aline Miranda, Salvina Campos e Vinícius Pedroso, por aceitarem, tão prontamente e gentilmente, o convite para uma data tão próxima e por cederem tempo e brilhantismo à finalização da construção deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Histotécnica, pela ajuda imprescindível com o processamento das amostras.

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia, por fazerem dos corredores C3 e F3 minha segunda casa por tantos anos, proporcionando uma convivência de aprendizado e afeto. Em especial, ao professor Marcelo Caliarí, que abriu as portas do laboratório de Protozooses para mim e me orientou por tantas vezes.

Aos professores Aline Miranda e Anilton Vasconcelos, que moldaram esse trabalho com valorosas sugestões no processo de Qualificação.

Aos colegas do LPCM e demais labs pelas experiências compartilhadas. Em especial, aos amigos Edna Victoria, Luiza Cioglia, Ivy Nayra, Cláudia Rocha, Bárbara Andrade, Tatiany Silveira, Diego Reis, Cezar Augusto e Flávia Bitencourt, que fizeram desses anos mais leves e doces, inclusive, literalmente falando (saúde grande).

Às alunas de IC, Joice, Ana Carolina, Bárbara e Karen, sempre ávidas pelo conhecimento, acendendo em mim o desejo de orientar. Sem o trabalho duro delas, esse momento não seria possível.

À equipe Grinberg Lab, que me ensinou a pensar a ciência de uma maneira ampla e inesquecível. Especialmente, à Lea Grinberg, outro exemplo de genialidade aliada à generosidade, que não só me acolheu no laboratório, mas também nos feriados em San Francisco, quando tive a oportunidade de conviver com sua linda família; ao Joseph Oh e Dulce Ovando, pelo aprendizado intensivo (I would like to say thank you to Joseph and Dulce for the intense learning).

À San Francisco, um dos meus lugares no mundo, que me trouxe um novo olhar sobre a vida; e aos amigos que lá fiz, especialmente, à Maira Okada, que além de me habituar ao consumo de margarita, contribuiu imensamente para a interpretação dos dados cognitivos apresentados neste trabalho.

À equipe do Biobank for Aging Studies da Universidade de São Paulo, especialmente, à Dra. Claudia Suemoto, pelo fornecimento dos cérebros controles, essenciais ao desenvolvimento da presente tese.

Aos pacientes do HC-UFMG e do Hospital Felício Rocho, por cederem, gentilmente, atenção e preciosos fragmentos de hipocampo; por me ensinarem a simplificar a ciência e a compreender que o objetivo mais belo da mesma é tocar e melhorar a vida humana.

À família Leal, por todo o carinho.

À minha psicóloga, Amanda, por me ajudar lidar com a ansiedade e a utilizá-la positivamente.

À Agnes e Maggie, minhas meninas de quatro patas, pela alegria e amor que aliviam o peso dos dias mais difíceis.

Resiliência

## RESUMO

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo de epilepsia focal mais frequente em indivíduos adultos. Por estar comumente associada à farmacorresistência, trata-se de uma doença com grande impacto econômico e social. A esclerose hipocampal (EH) é a principal lesão encontrada nos fragmentos hipocampais ressecados de pacientes farmacorresistentes. Histopatologicamente, a EH é caracterizada por perda neuronal e gliose ao longo da região de *Cornu Ammonis* (CA) do hipocampo. A EH está relacionada a diversas comorbidades da ELT, dentre as principais, destaca-se o declínio da memória episódica, principalmente dos domínios visual e verbal. No presente estudo, foi feita uma caracterização clínico-patológica da população estudada, pacientes com diagnóstico de ELT associada à EH (provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – e do Hospital Felício Rocho), e avaliou-se marcadores de gliose e apoptose, buscando associações e/ou correlações com aspectos clínicos, principalmente com impactos na memória verbal e visual. Os marcadores foram avaliados por reação imuno-histoquímica e análise morfométrica. Nesse sentido, demonstrou-se que a razão Bcl-2/Bax está aumentada em hipocampos escleróticos (com resultados similares entre EH tipo 1 e tipo 2), comparada à razão encontrada em hipocampos *post-mortem* de indivíduos não epiléticos. Apesar desse sinal anti-apoptótico, a expressão de caspase-3 clivada foi visualizada em neurônios granulares e células gliais na região de EH. Demonstrou-se também que a expressão de proteína glial ácida fibrilar (GFAP) e antígeno leucocitário humano-DR (HLA-DR), indicadores de astrogliose e microgliose, respectivamente, está aumentada em hipocampos escleróticos em comparação a hipocampos controles. Não houve diferença na expressão dessas proteínas entre EH tipo 1 e EH tipo 2. O aumento da microgliose foi associado a um pior desempenho no teste de Reprodução Visual antes do procedimento cirúrgico em pacientes com ELT. Os resultados desse estudo sugerem que a ativação de mecanismos anti-apoptóticos de via intrínseca não previnem morte de neurônios granulares e de células gliais. Além disso, demonstrou-se que a microgliose, ao contrário da astrogliose, está associada ao declínio da memória visual em pacientes com ELT.

**Palavras-chave:** epilepsia do lobo temporal, esclerose hipocampal, gliose, apoptose e memória

## ABSTRACT

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the focal epilepsy most frequent in adults and is commonly associated with drug resistance. Therefore, TLE promotes important economic and social impacts. Hippocampal sclerosis (HS) is the main tissue injury found in hippocampal sections of patients with drug resistant TLE. HS is characterized by neuronal loss and gliosis in Cornu Ammonis (CA) area. HS has been related with several cognitive comorbidities in TLE, such as decline of episodic memory, especially in the verbal and visual subfields. In the current study, we performed a clinicopathologic evaluation of the subjects with TLE-HS diagnosis (these subjects were provided by UFMG University Hospital and Felício Rocho Hospital, both in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). Markers for gliosis and apoptosis were analyzed and associated/correlated with clinical variables, especially verbal and visual memory performance. These markers were evaluated by immunohistochemistry and morphometric analyses. We demonstrated that Bcl-2/Bax ratio is increased in sclerotic hippocampi in comparison with post-mortem hippocampi of no-epileptic subjects. However, granular neurons and glial cells, located in HS region, express active caspase-3. We also demonstrated that the glial fibrillar acid protein (GFAP) and the human leukocyte antigen-DR (HLA-DR) are higher in sclerotic hippocampi than in control hippocampi. GFAP and HLA-DR indicates astrogliosis and microgliosis, respectively. HS type 1 and type 2 present similar expression of the both proteins. The microgliosis increase was associated with a worse performance in the Visual Reproduction test in patients with TLE, before the surgery. The results of the current study indicate that anti-apoptotic mechanisms of intrinsic pathway do not prevent apoptosis of glia and granular neurons in TLE-HS. Furthermore, we demonstrated that microgliosis, but not astrogliosis, is associated with visual memory decline in patients with TLE.

**Keywords:** temporal lobe epilepsy, hippocampal sclerosis, gliosis, apoptosis, memory

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Classificação básica das crises epiléticas segundo as novas normas da ILAE.**  
Adaptada de Fisher *et al.*, 2017 ..... 24
- Figura 2 – Lesões cerebrais agudas como fatores de risco de lesões epileptogênicas e epilepsia clinicamente detectável.** No período de latência, os fatores de risco são importantes para a evolução de uma lesão epileptogênica para epilepsia.  
Adaptado de Klein *et al.*, 2017..... 28
- Figura 3 – Representação dos eventos inflamatórios moleculares, que, de maneira cíclica, estão envolvidos na geração de crises, lesão tecidual e epileptogênese.**  
DAMPs: padrões moleculares associados a dano tecidual.  
Adaptado de Iori *et al.*, 2016..... 31
- Figura 4 – Classes de fármacos mais utilizados no tratamento de pacientes com ELT farmacorresistente no HC-UFMG.** ..... 37
- Figura 5 – Subclassificação da Esclerose Hipocampal na ELT, segundo os critérios da ILAE.**  
Estão evidenciadas, de acordo com a distribuição da perda neuronal, a EH tipo 1 (A), tipo 2 (B), tipo 3 (C) e ausência de EH (D) em amostras de hipocampo provenientes de pacientes com ELT. Todas as colorações representam reação imuno-histoquímica anti- proteína nuclear neuronal (NeuN) com contracoloração com hematoxilina. CA: Cornus Ammonis; sb: subculum; DGe: porção externa do giro denteado; DGi: porção interna do giro denteado; ELT: epilepsia do lobo temporal; EH: esclerose hipocampal.  
Fonte: Blumcke *et al.*, 2013..... 43
- Figura 6 – Fluxograma de seleção de blocos parafinados contendo hipocampo escleróticos utilizados.**..... 51
- Figura 7 – Possíveis vias de morte celular envolvidas na perda de neurônios piramidais, neurônios granulares e células da glia em hipocampos escleróticos de pacientes com ELT.**..... 107
- Figura 8 – Relação entre apoptose glial e expansão da EH, possivelmente, culminando em declínio da memória visual em pacientes com ELT.** Além da morte neuronal, a microgliose (mas não a astrogliose) parece contribuir para um pior prognóstico cognitivo na ELT. .... 108

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Relação de estudos brasileiros contemplando estudo histopatológico de fragmentos hipocampais ressecados de pacientes com ELT farmacorresistente, publicados nos últimos 10 anos em língua inglesa e disponíveis na base de dados *MedLine* .....46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA: ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AQP: aquaporina

ATP: adenosina trifosfato

AVC: acidente vascular cerebral

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE: barreira hemato-encefálica

CA: cornu ammonis

Ca<sup>2+</sup>: íon cálcio

CD: cluster de diferenciação

COEP: Comitê de Ética em Pesquisa

DAB: 3-3' diaminobenzina peroxidase

DAMPs: padrões moleculares associados a dano tecidual

DGe: giro denteado externo

DGi: giro denteado interno

DO: densidade óptica

EEG: eletroencefalograma

EH: Esclerose Hipocampal

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

ELTM: Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

GABA: ácido gama-aminobutírico

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

HLA-DR: antígeno leucocitário humano DR

HRP: *horseradish peroxidase*

HSP: proteína de choque térmico

H&E: hematoxilina e eosina

I: luz transmitida

IL: interleucina

ILAE: Liga Internacional Contra Epilepsia

I<sub>0</sub>: luz incidente

K<sup>+</sup>: íon potássio

MAP2: proteína associado a microtúbulo-2

mGluR5: receptor metabotrópico de glutamato-5

MT: metalotioneína glial

NATE: Núcleo de Tratamento Avançado de Epilepsia

Na<sup>+</sup>: íon sódio

NFG: fator de crescimento neuronal

NMDA: N-metil D- aspartato

NT3: neurotrofina 3

NeuN: proteína nuclear neuronal

p75<sup>NTR</sup>: receptor de neurotrofina p75

r: Coeficiente de Pearson

rs: Coeficiente de Correlação de Spearman

Sb: subculum

SNC: Sistema Nervoso Central

TNF: fator de necrose tumoral

Trk: receptor tirosina cinase

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DOS ARTIGOS**

AEDs: anti-epileptic drugs

BBB: blood-brain barrier

GFAP: glial fibrillary acidic protein

HLA-DR: human leukocyte antigen DR

HS: hippocampal sclerosis

LHS: left Hippocampal Sclerosis

MRI: Magnetic Resonance Imaging

NeuN: neuronal protein

OD: optical density

RHS: right Hippocampal Sclerosis

SD: standard deviation

TLE: Temporal Lobe Epilepsy

TSPO: translocator protein

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1	EPILEPSIA.....	21
2.1.1	Classificação básica das crises epiléticas.....	22
2.2	EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL.....	24
2.2.1	Epidemiologia.....	25
2.2.2	Comprometimento cognitivo na ELT.....	25
2.2.3	Etiologia e fatores de risco.....	26
2.2.4	Patogênese da ELT.....	28
2.2.5	Inflamação na ELT e na progressão da EH.....	30
2.2.6	Farmacorresistência.....	35
2.2.7	Farmacoterapia na ELT.....	35
2.2.8	Tratamento cirúrgico: ressecção hipocampal.....	37
2.2.9	Esclerose hipocampal.....	39
3.	JUSTIFICATIVA, HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	48
3.1	HIPÓTESE.....	48
3.2	Objetivos.....	49
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1	POPULAÇÃO ESTUDADA.....	50
4.2	Avaliação da memória verbal e visual.....	51
4.3	Coleta de dados de clínicos.....	52
4.4	Histopatologia e imuno-histoquímica.....	52
4.5	Classificação da Esclerose Hipocampal.....	53
4.6	Morfometria digital.....	53
4.7	Análise estatística.....	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1	Classificação da Esclerose Hipocampal e avaliação da gliose e da via intrínseca da apoptose em hipocampos de pacientes com ELT.....	67
5.1.1	Objetivos específicos:.....	67

5.2	Avaliação da associação entre gliose e déficits cognitivo em pacientes com ELT associada à Esclerose Hipocampal.....	91
5.2.1	Objetivos específicos.....	91
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	106
7.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	109
8.	ARTIGOS COM TEMA RELACIONADO À TESE .....	110

## 1. INTRODUÇÃO

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o principal tipo de epilepsia focal em adultos e apresenta alto índice de farmacoresistência (Blumcke *et al.*, 2012; Engel *et al.*, 2012). Dessa forma, trata-se de uma doença de grande relevância clínica e econômica, uma vez que a farmacoresistência é responsável pela maior parte dos gastos na assistência ao paciente com epilepsia (Curia *et al.*, 2014). Na ELT, as crises epiléticas originam-se no lobo temporal, principalmente no hipocampo. Assim, a amigdalohipocampectomia seletiva é, atualmente, uma opção efetiva para pacientes portadores de ELT farmacoresistentes e elegíveis à cirurgia (Engel, 2001). A esclerose hipocampal (EH), caracterizada por gliose e perda neuronal, é a alteração histopatológica mais frequente na ELT (56% a 70% dos casos) e pode ser classificada em tipo 1, 2 ou 3 de acordo com distribuição e intensidade da gliose e perda neuronal ao longo da região do *Cornu de Ammonis* (CA) (Blümcke *et al.*, 2013; Thom, 2014).

Estudos utilizando modelos animais sugerem que mecanismos inflamatórios podem atuar de forma crônica, na formação de áreas de esclerose e focos epiléticos, ou de forma aguda, desencadeando ou exacerbando crises epiléticas. A ativação de micróglia e astrócitos residentes é uma fonte importante de mediadores inflamatórios, como Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) (De Simoni *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2009; Vezzani *et al.*, 2011). A reatividade das células da glia também pode atuar na amplificação da excitotoxicidade neuronal, ao promover disfunção dos receptores de glutamato e do ciclo glutamina-glutamato (Eid *et al.*, 2004; Curia *et al.*, 2014). Com o comprometimento da barreira hematoencefálica (BHE) promovido por mediadores como as citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão endotelial, o processo inflamatório pode se tornar persistente, sendo amplificado e não resolutivo, induzindo mecanismos de apoptose (Eid *et al.*, 2004; Roseti *et al.*, 2015). Tanto a via apoptótica intrínseca quanto a extrínseca parecem estar envolvidas na morte de neurônios e células da glia, com consequente intensificação da EH. Paralelamente, mecanismos anti-apoptóticos são ativados, a fim de minimizar esse processo (Le *et al.*, 2002; Henshall e Simon, 2005; Engel e Henshall, 2009). Mais estudos são necessários para melhor compreender o balanço entre mecanismos inflamatórios e anti/pró-apoptóticos, bem como o papel destes na atividade glial, visto que

tanto a gliose quanto a morte de células gliais são fatores epileptogênicos e a interação das mesmas é pouco estudada na ELT humana (Henshall, 2009). Além disso, não está claro se os mesmos mecanismos apoptóticos promovem morte tanto de neurônios quanto de células da glia.

A perda neuronal induzida por processos excitotóxicos e apoptóticos está intrinsecamente relacionada ao comprometimento cognitivo de pacientes com ELT, previamente ao processo cirúrgico (Bell *et al.*, 2011). Diversos estudos tem mostrado associação entre redução da densidade neuronal nas regiões hipocampais CA1, CA4 e do giro denteado com a redução da performance dos pacientes em testes de memória verbal e visual, principais domínios da memória comprometidos na ELT (Coras *et al.*, 2014; Comper *et al.*, 2017; Prada Jardim *et al.*, 2018). Entretanto, embora as células da glia sejam importantes para a formação e consolidação da memória e a reativação glial esteja intrinsecamente associada à perda neuronal (Babayán *et al.*, 2012), não há estudos relacionando a gliose presente na EH e o declínio cognitivo em pacientes com ELT.

Portanto, a presente tese contribuirá para o entendimento dos mecanismos de apoptose neuronal e glial, bem como da conexão entre a ativação de astrócitos e micróglia com o déficit cognitivo apresentado pelos pacientes com ELT associada à EH, previamente à amigdalohipocampectomia seletiva.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 EPILEPSIA

A epilepsia é uma doença cerebral causada pela recorrência de crises epiléticas espontâneas, com consequências neurobiológicas, cognitivas e sociais (Fisher *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2014). Clinicamente, a epilepsia é definida por duas ou mais crises com um intervalo de 24 horas entre elas; uma crise espontânea após duas crises também espontâneas em um intervalo inferior a dez anos pode ser diagnosticada como síndrome epilética. A ocorrência de, pelo menos, uma crise nos últimos dois anos caracteriza epilepsia ativa (Borges *et al.*, 2004). Segundo as últimas definições da *International League Against Epilepsy* (ILAE), a epilepsia não pode ser considerada curada ou em remissão, mas, pacientes que não apresentam crises por dez anos consecutivos e cujos medicamentos anticonvulsivantes tenham sido suspensos por cinco anos podem ser considerados como em fase de resolução da doença (Fisher *et al.*, 2014).

A epilepsia é uma das desordens neurológicas mais comuns (Ngugi *et al.*, 2010), afetando 50 milhões de indivíduos no mundo, dentre os quais, aproximadamente, 30% são refratários às terapias medicamentosas disponíveis. A maioria dos pacientes (80%) vive em países em desenvolvimento (WHO, 2016). Isso está diretamente relacionado à falta de conhecimento sobre fatores de risco, busca tardia por auxílio médico, estigma social, escassez de equipamentos, como de ressonância nuclear magnética (RNM) e de eletroencefalograma (EEG) para um diagnóstico conclusivo e falta de recursos humanos para acompanhamento dos pacientes, o que coloca a epilepsia entre as vinte principais doenças incapacitantes a nível mundial (Mbuba e Newton, 2009).

Mundialmente, a prevalência da doença ativa é de 6,38 a cada mil pessoas e a incidência cumulativa anual, de 67,8 para cada 100.000 pessoas (Fiest *et al.*, 2017). As taxas de incidência e prevalência são mais baixas em países desenvolvidos comparados a países em desenvolvimento, revelando um caráter socioeconômico da doença (Neligan *et al.*, 2012). Nesse contexto, é importante ressaltar que, proporcionalmente à incidência, a prevalência da

doença nos países em desenvolvimento é baixa, devido à maior taxa de mortalidade (Carpio e Hauser, 2009; Newton e Garcia, 2012).

No Brasil, 2% da população são portadores de epilepsia, que afeta, principalmente, crianças e idosos, com leve predomínio no sexo masculino (Teixeira e Salgado, 2004; Neto e Marchetti, 2005). Foi demonstrada uma prevalência elevada de crises em crianças jovens associada a acomodações pobres e privação de água tratada (Abib *et al.*, 2007). Estudos contemplando dados epidemiológicos das epilepsias no Brasil são bastante escassos. Em 1986, na cidade de São Paulo, a prevalência da doença era de 11,9/1000 habitantes (Marino Jr *et al.*, 1986). Em 2005, no Rio de Janeiro, a prevalência de epilepsia ativa era de 5,1/1000 habitantes (Gomes *et al.*, 2002). Em 2015, 2192 brasileiros morreram por consequência da epilepsia e, em período cumulativo entre 2012-2015, foram contabilizadas 8459 mortes (DataSUS, 2015). Vale ressaltar a epilepsia está associada a um aumentado risco de morte prematura, particularmente nos primeiros anos após o diagnóstico e que esse risco é subestimado, uma vez que muitos pacientes vão a óbito por causas secundariamente relacionadas à epilepsia, como acidentes automobilísticos, queimaduras, quedas e afogamentos (Neligan *et al.*, 2012). Com relação aos dados de morbidade, entre 2014 e 2016, foram notificados, aproximadamente, 200 mil casos de internações por epilepsia (DataSUS, 2016).

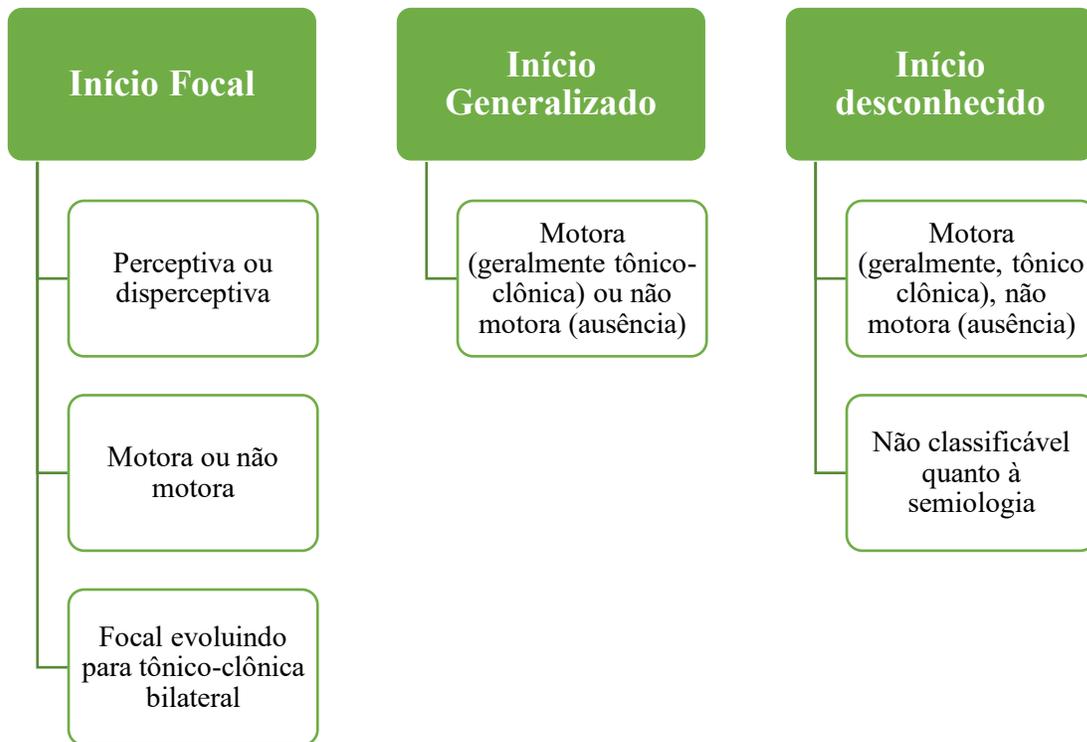
### **2.1.1 Classificação básica das crises epilépticas**

As crises epilépticas são manifestações clínicas decorrentes de disfunção neuronal transitória (hiperatividade anômala e simultânea) e podem ser classificadas em crises de origem focal ou generalizada, dependendo da região e extensão afetada. As focais atingem regiões encefálicas limitadas (unilaterais) e as generalizadas, os dois hemisférios cerebrais (Fisher *et al.*, 2014; Seneviratne *et al.*, 2014; Renzel *et al.*, 2015). Além dessas subdivisões clássicas, recentemente, foi adicionada a classificação de origem desconhecida (Falco-Walter *et al.*, 2017).

Mais especificamente, as crises focais, previamente denominadas parciais, podem ocorrer com manutenção da consciência, sendo classificadas em perceptivas (antigamente chamadas de parciais simples) ou com comprometimento da consciência, disperceptivas (denominadas anteriormente como parciais complexa). Segundo a nova classificação da ILAE, nas crises disperceptivas não ocorre, necessariamente, perda total da consciência, podendo esta ser apenas parcial ou marcada por um episódio de amnésia após a crise (Falco-Walter *et al.*, 2017; Fisher, 2017a). Assim, em muitos casos, não é possível, por anamnese ou relato do paciente, determinar se a crise foi perceptiva ou disperceptiva. As crises focais podem ser subdivididas, ainda, quanto à presença ou ausência de manifestações motoras, de acordo com sua semiologia inicial. Além disso, uma crise com início focal pode se tornar bilateral, com manifestações motoras do tipo tônico-clônicas (denominada anteriormente como focal secundariamente generalizada) (Fisher *et al.*, 2017).

Com relação às crises generalizadas, apenas a classificação quanto à motricidade é empregada, uma vez que a maioria dos pacientes que se enquadram nessa subdivisão apresentam crises disperceptivas. Assim, as crises generalizadas podem ser motoras, geralmente tônico-clônicas, ou não motoras (ausência) (Falco-Walter *et al.*, 2017). As crises de ausência são caracterizadas por inibição de movimentos e de responsividade, sendo mais comuns em pacientes jovens. As crises generalizadas de ausência tendem a apresentar automatismos menos complexos que as focais não motoras, mas a distinção entre elas é subjetiva ao se avaliar apenas a semiologia. Ademais, quando a crise tem origem bilateral assimétrica, torna-se difícil determinar na clínica se esta tem realmente início generalizado ou focal. Nesses dois contextos, o EEG é um exame importante para uma classificação mais segura quanto ao início da crise e uma possível generalização (Fisher, 2017a; Fisher *et al.*, 2017).

Caso não seja possível determinar se a crise é focal ou generalizada com base nos dados clínicos e no traçado eletrográfico, a crise é considerada de início desconhecido. A maioria dessas crises apresenta semiologia tônico-clônica ou não motora (focal disperceptiva ou generalizada com ausência) (Fisher, 2017b). A figura 1 sintetiza a classificação básica das crises segundo as novas diretrizes da ILAE.



**Figura 1 – Classificação básica das crises epilépticas segundo as novas diretrizes da ILAE.**

ILAE: Liga Internacional contra Epilepsia  
 Adaptada de Fisher *et al.*, 2017.

Dentre as epilepsias caracterizadas por crises com início focal, destaca-se a ELT, que apresenta grande relevância clínica em função de sua alta incidência, farmacorresistência e morbidade (Curia *et al.*, 2014).

## 2.2 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

A ELT é o tipo de epilepsia focal mais comum, sendo subdividida em neocortical ou mesial, de acordo com a localização do foco epiléptico (Engel Jr, 1996). A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM), em função da maior prevalência e de cursar, recorrentemente, com resistência à farmacoterapia antiepiléptica, é uma condição clínica impactante na qualidade de vida do paciente e nos gastos do sistema público de saúde (Engel Jr, 1993; French *et al.*, 1993). O paciente com ELTM apresenta crises iniciando-se na região mesial do lobo temporal, acometendo amígdala, porção anterior do hipocampo e giro para-hipocampal (Engel Jr, 1996; Engel, 2001).

### **2.2.1 Epidemiologia**

A ELT é o tipo mais prevalente de epilepsia entre adultos e tem início na infância, predominantemente. Estima-se que quase todos os pacientes (90%) com até 20 anos tenham tido a primeira crise espontânea antes dos 13 anos e que, em 60% desses casos, essa crise ocorra antes dos três anos de idade, sendo mais recorrente no primeiro ano de vida da criança (Lopes e Junior, 2007; Ferreira, 2009). Dessa forma, pode-se concluir que o tempo de doença desses pacientes é prolongado, impactando intensamente na qualidade de vida.

Outro fator importante é o elevado gasto do sistema de saúde que os pacientes com ELT acarretam. Esses impactos são subestimados e abrangem tanto os fatores diretos da doença (custo com tratamento farmacológico, internações, exames de acompanhamento e procedimento cirúrgico), quanto fatores indiretos (incapacitação do indivíduo por algum acidente secundário à epilepsia, redução da produtividade no ambiente de trabalho, morte prematura) (Cockerell *et al.*, 1994; Heaney, 1999; Begley e Durgin, 2015). Um estudo observacional prospectivo feito na Itália mostrou que 77% dos custos com farmacoterapia anticonvulsivante correspondem ao tratamento de pacientes farmacorresistentes (Strzelczyk *et al.*, 2008). Além disso, os déficits cognitivos, importante comorbidade associada à ELT, sobretudo nos casos de farmacorresistência, também se apresenta como um fator incapacitante e que demanda acompanhamento neuropsicológico (Allone *et al.*, 2017). Diante do exposto, estudos atuais e em maior escala sobre o impacto econômico e social da ELT são extremamente necessários para avaliar o custo benefício do procedimento cirúrgico na população (Mansouri *et al.*, 2015).

### **2.2.2 Comprometimento cognitivo na ELT**

O declínio cognitivo tem sido descrito como uma frequente comorbidade na ELT. Diversos estudos mostram a associação entre ELT, principalmente associada à farmacorresistência, com prejuízos nas áreas de memória, atenção, função executiva e linguagem (Pereira *et al.*, 2010; Riley *et al.*, 2010). Além disso, alterações morfológicas detectadas em exames de neuroimagem também tem demonstrado associação e correlação com pior performance em testes de cognição múltipla (Oyegbile *et al.*, 2006).

O prejuízo da memória é a mais recorrente e impactante comorbidade cognitiva na ELT, reduzindo significativamente a qualidade de vida e capacidade de trabalho dos pacientes. Nesse contexto, variáveis clínicas intrínsecas à ELT, como início precoce das crises epiléticas, alta frequência das mesmas e prolongado tempo de doença tem sido investigados enquanto fatores associados a déficits de memória mais acentuados. Entretanto, os achados são contraditórios, alguns estudos sugerem que tais variáveis influenciam na redução da performance dos pacientes em testes de memória empregados na clínica (Allone *et al.*, 2017), enquanto outros apontam que, apesar de fatores relevantes para a expansão da lesão tecidual, essas características clínicas não estão correlacionadas com declínio da função de memória na ELT (Tai *et al.*, 2017).

O principal domínio da memória afetado pela ELT é o relativo à memória declarativa episódica (Helmstaedter, 2002; Bell *et al.*, 2011). Este fato ocorre uma vez que a região mesial do lobo temporal é o principal foco epileptogênico na ELT. Sabe-se que, nesta região, estão localizadas importantes estruturas para a aquisição e consolidação da memória episódica, o hipocampo e o giro para-hipocampal (Helmstaedter e Elger, 2009).

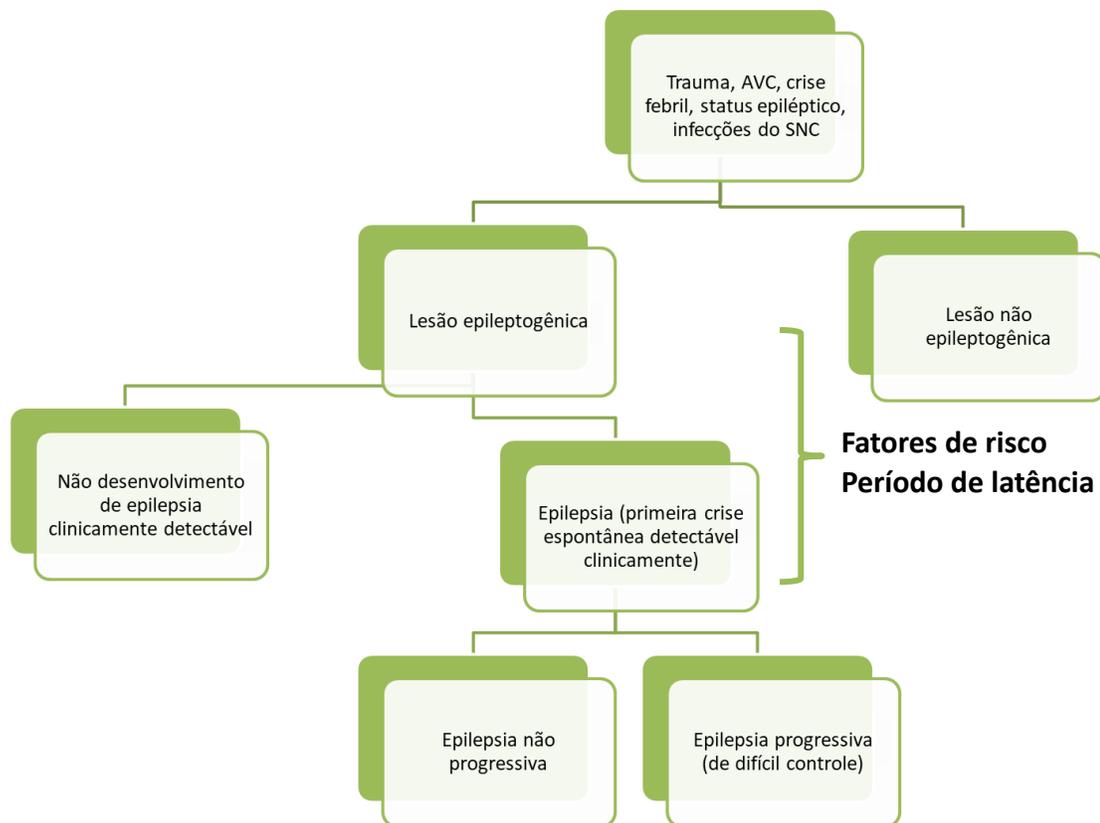
Entretanto, é importante ressaltar que a atividade ictal e interictal interfere na rede córtico-temporal, tendo repercussão em estruturas extratemporais, o que pode desencadear múltiplas disfunções cognitivas, sobretudo em casos de crises epiléticas generalizadas (Hermann *et al.*, 2006).

### **2.2.3 Etiologia e fatores de risco**

A etiologia da epilepsia é um fenômeno complexo e resultante da combinação de fatores genéticos (Cendes *et al.*, 2008), ambientais (Hauser, 1990) e infecciosos (Kobayashi *et al.*, 2001). Entretanto, especificamente para a ELT, ainda não há informações genéticas bem estabelecidas. Em 1994, foi descrito, pela primeira vez, um caso de epilepsia familiar em quatro indivíduos de duas gerações e, a partir de então, a ELT familiar foi subdividida em neocortical e mesial. Então, foi possível distinguir padrões de herança genética diferentes para os subtipos (Crompton *et al.*, 2010). Recentemente, foi demonstrado que os alelos 80I e

80M do gene APOBEC1 estão associados, respectivamente, com crises focais em pacientes com ELT farmacorresistente (Kankowski *et al.*, 2018). Foi demonstrada, ainda, uma associação entre elementos imunogenéticos e ELT cursando com EH. Mais especificamente, pacientes com ELT apresentam um genótipo associado à produção de IL-1 $\beta$ , dificultando o controle das crises (Leal *et al.*, 2017).

Com relação aos fatores ambientais e infecciosos, traumatismo crânio-encefálico, devido a alguma intercorrência durante o parto ou a acidentes, é um importante fator de risco (Hauser, 1990). Encefalites virais e neurocisticercose também estão associadas à ELT, justificando a maior incidência da doença em países com condições sanitárias inadequadas e difícil acesso ao sistema de saúde (Kobayashi *et al.*, 2001; Newton e Garcia, 2012). Lesões cerebrais agudas, como acidente vascular cerebral (AVC), infecções (neurocisticercose, principalmente) e *status* epiléptico são importantes causadores de alterações no tecido cerebral (Kankowski *et al.*, 2018; Klein *et al.*, 2018), com desfecho de epilepsia em cerca de 20% dos casos, dos quais parte pode evoluir para difícil tratamento (Figura 2) (Epilepsies e Syndromes, 1989; Klein *et al.*, 2018). Especificamente no caso de crianças entre seis meses e cinco anos, a crise febril pode aumentar a chance de subsequentes crises espontâneas em 2 a 5% dos casos, podendo desencadear um quadro de *status* epilético febril. A crise febril é o fenômeno convulsivo mais frequente em crianças e consiste em convulsão associada à febre na ausência de infecções no sistema nervoso central (SNC) (Pediatrics, 2011; Gencpinar *et al.* 2017).



**Figura 2 – Lesões cerebrais agudas como fatores de risco de lesões epileptogênicas e epilepsia clinicamente detectável.** No período de latência, os fatores de risco são importantes para a evolução de uma lesão epileptogênica para epilepsia.

SNC: sistema nervoso central

Adaptado de Klein *et al.*, 2017.

#### 2.2.4 Patogênese da ELT

A transmissão do impulso nervoso ocorre por processos de despolarização, repolarização e hiperpolarização neuronal. Esses fenômenos consistem na alteração dinâmica da carga elétrica da membrana citoplasmática do neurônio, que depende do fluxo iônico e liberação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios. Quando há adequada ativação de canais iônicos e equilíbrio de estímulos excitatórios e inibitórios, os neurônios podem entrar em estado de excitabilidade e sincronia, mecanismos pelos quais exercem suas funções (Engel, 2013; Ye e Kaszuba, 2017).

A atividade sincrônica é caracterizada pela despolarização simultânea de um grupo de neurônios. Quando essa atividade ocorre exacerbadamente, sendo denominada

hipersincrônica, resulta em hiperexcitabilidade neuronal e, em alguns casos, em crise epiléptica. O equilíbrio da atividade entre neurônios excitatórios é essencial para evitar os eventos de hipersincronia e hiperexcitabilidade (Ye e Kaszuba, 2017).

Tradicionalmente, ao liberar o ácido gama-aminobutírico (GABA), o interneurônio GABAérgico atua como inibidor da hiperatividade neuronal. Uma hipótese é que, durante uma crise convulsiva, a capacidade inibitória do GABA, a fim de contrabalançar a despolarização da membrana e o disparo do potencial de ação, é diminuída, facilitando a sincronização neuronal. Corroborando essa hipótese, foram encontradas anormalidades na função GABAérgica inibitória em modelos genéticos e experimentais de epilepsia (Olsen e Avoli, 1997; Delorey e Olsen, 1999). Além disso, foi demonstrada a perda de interneurônios inibitórios hipocampais na ELT (De Lanerolle *et al.*, 1989). Entretanto, estudos recentes tem demonstrado um papel excitatório de interneurônios GABAérgicos, por meio de alguns mecanismos como excitação de neurônios pós-sinápticos; depleção, por retroalimentação do próprio GABA, reduzindo seu efeito inibitório sobre neurônios piramidais; e inibição de interneurônios que inibem a hiperexcitabilidade neuronal (Ye e Kaszuba, 2017).

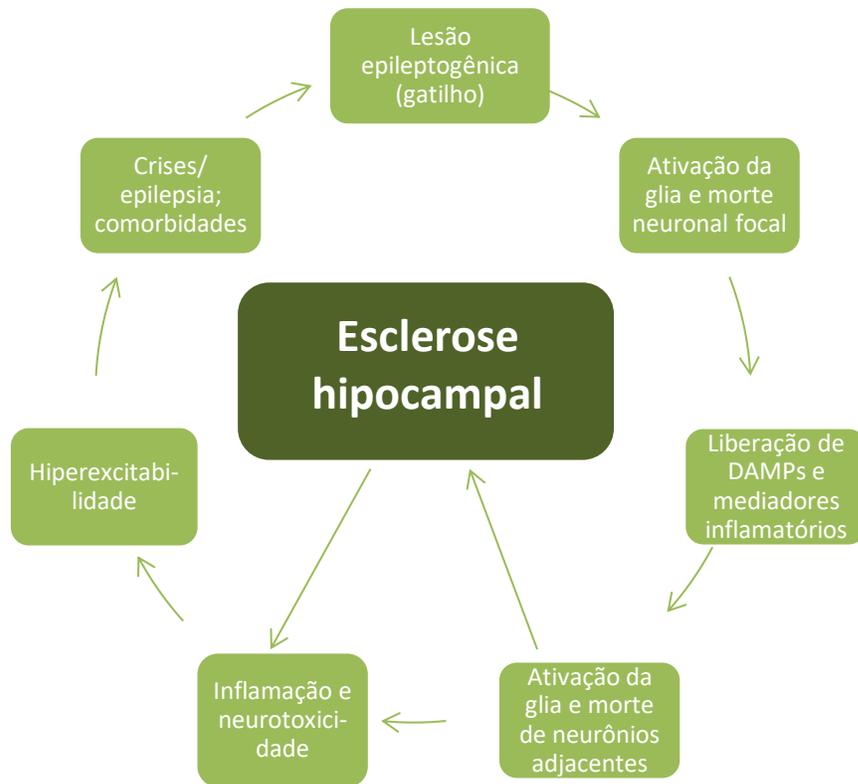
Quanto à atividade excitatória, o glutamato, principal neurotransmissor excitatório em mamíferos adultos, promove morte neuronal por excitotoxicidade glutamaérgica quando sua concentração é aumentada na fenda sináptica, devido à despolarização neuronal exacerbada. Esse processo é possível devido à interação exacerbada do glutamato com receptores ionotrópicos e metabotrópicos, promovendo contínua despolarização da membrana celular e liberação de mais glutamato, com consequente hiperexcitabilidade neuronal (Barker-Haliski e White, 2015). Em suma, as crises epilépticas são caracterizadas por um aumento na excitabilidade neuronal e hipersincronia da atividade das vias de condução cortical. No entanto, a epileptogênese e ictogênese ainda não foram completamente elucidadas, é preciso estudar a relação de diversos mecanismos envolvidos e, nesse sentido, os modelos animais são uma importante ferramenta (Marchi *et al.*, 2014).

Recentemente, o papel da inflamação na patogênese da epilepsia tem sido demonstrado, reforçando a visão da interação direta entre periferia e inflamação tecidual local (Vezzani *et*

*al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2016). A hiperexcitabilidade neuronal pode ser afetada pela hiperativação de células da glia e, conseqüentemente, pelo aumento da produção de mediadores inflamatórios, levando à ativação de diversas vias sinalizadoras (Balosso *et al.*, 2005; Vezzani *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2012; Iori *et al.*, 2016).

### **2.2.5 Inflamação na ELT e na progressão da EH**

Um contínuo processo inflamatório tem sido demonstrado na epilepsia humana a partir de tecidos cerebrais ressecados (Van Gassen *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009). Diferentes estudos em modelos animais sugerem que mecanismos inflamatórios podem atuar na formação de áreas de EH e focos epilépticos, desencadeando ou prolongando as crises. Além disso, há algumas evidências de que a inflamação induzida pela ativação exacerbada do sistema imunológico ou por uma convulsão isolada em cérebros ainda não maduros pode predispor à hiperexcitabilidade neuronal na fase adulta, e de que a inflamação cerebral crônica, mediada por altos níveis de citocinas, é um fator epileptogênico (Vezzani *et al.*, 2013). Diversos mediadores inflamatórios como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF encontram-se aumentados no tecido cerebral de ratos após a indução de status epiléptico e crises convulsivas generalizadas (De Simoni *et al.*, 2000; Johnson e Kan, 2010). A ativação de micróglia e astrócitos residentes é uma fonte importante desses mediadores (Balosso *et al.*, 2005; Vezzani *et al.*, 2011; Vezzani *et al.*, 2013) e já foi detectada aumentada em hipocampo de pacientes portadores de ELT (Kandratavicius *et al.*, 2015; Puttachary *et al.*, 2015). Com o comprometimento da BHE, promovido por mediadores como as citocinas (Van Vliet *et al.*, 2007) e posterior recrutamento de neutrófilos ao cérebro (Ferrari *et al.*, 2004), o processo inflamatório torna-se persistente e não resolutivo, ocasionando um processo crônico de indução de crises, aumento da inflamação e extensão da lesão tecidual (Klein *et al.*, 2018) (Figura 3).



**Figura 3 – Representação dos eventos inflamatórios moleculares que, de maneira cíclica, estão envolvidos na geração de crises, lesão tecidual e epileptogênese.**

DAMPs: padrões moleculares associados a dano tecidual.

Adaptado de Iori *et al.* (2016)

#### 2.2.5.1 Gliose na ELT associada à EH

A gliose ou astromicrogliose, caracterizada pela proliferação e reatividade de astrócitos e micróglia, é um importante achado histopatológico em processos inflamatórios no cérebro e está fortemente associada com a EH presente na ELT (Vezzani *et al.*, 2011; Steinhäuser *et al.*, 2012; Devinsky *et al.*, 2013; Vezzani *et al.*, 2013).

##### I. Papel dos astrócitos na ELT

O astrócito é o tipo de célula mais abundante do SNC, sendo essencial à sustentação do tecido nervoso e à transferência de nutrientes do sangue para os neurônios. Isso porque ele se associa anatomicamente às células endoteliais, funcionando como uma ponte entre elas e os corpos

neuronal (Ronaldson e Davis, 2012). Além disso, sabe-se que os astrócitos produzem gliotransmissores (como adenosina, glutamato e GABA) e atuam na recaptação de glutamato na fenda sináptica (Pascual *et al.*, 2005; Perea *et al.*, 2009). Ou seja, essas células são essenciais para sincronização neuronal e, paralelamente, para evitar a hipersincronização e excitotoxicidade glutamatergica (Curia *et al.*, 2014). De fato, foi demonstrado que o aumento do influxo de cálcio nos astrócitos em secções hipocámpais promove liberação exacerbada de glutamato (Fellin *et al.*, 2004).

A ativação de células da glia, apesar de seu importante papel na imunidade inata do SNC, promove liberação de mediadores inflamatórios, que interagem com receptores gliais e de neurônios, induzindo alterações no fluxo iônico, por meio do comprometimento da função de canais voltagem-dependentes. Esse processo leva à liberação de neurotransmissores excitatórios, disfunção dos receptores de glutamato e inibição da produção astrocitária de glutamina sintase (enzima importante na conversão do glutamato em glutamina) (Eid *et al.*, 2004; Curia *et al.*, 2014). Com aumento do glutamato na fenda sináptica, ocorre morte neuronal por excitotoxicidade (Vezzani *et al.*, 2013).

Já foi demonstrado, utilizando modelos animais e em pacientes com epilepsia, que mudanças funcionais induzidas pelas crises promovem a desregulação de canais de potássio em astrócitos e compromete as junções comunicantes na ELT (Klein *et al.*, 2018). Essas mudanças podem interferir na comunicação entre neurônios e glia e reduzir a recaptação e redistribuição do potássio extracelular, contribuindo para e sendo intensificadas pela ictogênese. A reatividade de astrócitos induz e é retroalimentada pela ativação da micróglia (Hinterkeuser *et al.*, 2000; Steinhäuser *et al.*, 2012; Bedner *et al.*, 2015).

## II. Papel da micróglia no ELT

A micróglia é uma linhagem de células mieloides residente do SNC, que corresponde a cerca de 20% do total de células da glia. Em situações fisiológicas, a micróglia apresenta morfologia ramificada e estado quiescente, mantendo a homeostase, vigilância imunológica e produção de fatores de crescimento (Ronaldson e Davis, 2012; Ritzel *et al.*, 2015). A

micróglia possui diversos receptores para neurotransmissores, além de estabelecer rápido contato com elementos sinápticos durante a atividade neuronal, sugerindo capacidade de modular a transmissão neuronal ativamente (Curia *et al.*, 2014).

A rápida ativação microglial ocorre nos processos neuroinflamatórios de diversas etiologias. Alguns pacientes com ELT associada à EH apresentam predisposição genética para produzir citocinas que modulam os efeitos de neurotransmissores neurotóxicos durante a excitação ou inflamação no SNC. Essas citocinas podem iniciar crises epiléticas, envolvendo mecanismos iniciados pela micróglia reativa (Kanemoto *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2010). Nesse cenário, a micróglia residente assume morfologia ameboide, com função fagocitária, e libera mediadores inflamatórios, dentre eles citocinas (IL-6, TNF e IL-1 $\beta$ ), quimiocinas, padrões moleculares associados a dano tecidual (DAMPs) e, que também contribuem para o comprometimento das junções comunicantes dos astrócitos e disfunção dos canais iônicos (Vezzani e Granata, 2005; Vezzani *et al.*, 2013).

Aparentemente, há uma cinética das células residentes durante e após o ictus, enquanto fontes de mediadores inflamatórios. No caso da rápida liberação da citocina IL-1 $\beta$ , já foi demonstrado que a micróglia é a responsável pela mesma durante a crise epilética, enquanto que os astrócitos superexpressam essa citocina em caráter crônico após a crise (Ravizza *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010).

A resposta inflamatória exacerbada promove aumento da permeabilidade da BHE e a infiltração de leucócitos e albumina contribui para as alterações astrocitárias supracitadas. Esse processo facilita o aumento do potássio intracelular e do influxo celular de cálcio e água, promovendo lesões neuronais (como degeneração e morte) e intensificando a EH (Abbott e Friedman, 2012; Weissberg *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2018).

#### 2.2.5.2 Morte neuronal e de células da glia

Conforme explicitado anteriormente, a inflamação é um gatilho importante para a intensificação da perda neuronal, principalmente, induzida por glutamato. Isso ocorre, devido a uma disfunção dos transportadores de membrana dependentes de energia, como a bomba

de sódio e potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase) e de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPase). Assim, o efluxo de cálcio na forma iônica ( $\text{Ca}^{2+}$ ) torna-se limitado, bem como sua recaptação pelo retículo endoplasmático, havendo acúmulo desse íon no citoplasma e consequente despolarização celular e ativação de hidrolases (Kalogeris *et al.*, 2012; Kassner e Merali, 2015). A despolarização celular permite que o glutamato atravesse a membrana plasmática e acumule-se nas fendas pré e pós-sináptica (Kassner e Merali, 2015). Os receptores ionotrópico de glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), são bastante expressos no hipocampo, portanto, a neurotoxicidade glutamatergica é um importante fator para a necrose neuronal e expansão da EH (Bennett *et al.*, 1996; Ozawa *et al.*, 1998).

Os mecanismos de morte neuronal e glial hipocampais na ELT ainda precisam ser melhor elucidados, entretanto, estudos utilizando modelos animais e hipocampo de pacientes com ELT sugerem que a apoptose também assume importante papel na morte celular em decorrência da epilepsia (Henshall e Simon, 2005). A apoptose pode ocorrer por ativação dos mecanismos da via intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (citoplasmática), os quais convergem em uma via final comum, clivando a caspase-3 (Broughton *et al.*, 2009). Assim, a caspase-3 clivada atua no final da via de apoptose e, portanto, sua detecção pode ser diretamente relacionada com a ocorrência de apoptose (Fox e Aubert, 2008; Broughton *et al.*, 2009). A via intrínseca parece estar particularmente envolvida na perda neuronal na ELT (Henshall *et al.*, 2000; Uysal *et al.*, 2003; Engel e Henshall, 2009). Basicamente, os genes pró-apoptóticos da família das proteínas Bcl-2, como o Bax, translocam para a mitocôndria, levando ao aumento da permeabilidade membranar da mesma e consequente liberação de citocromo c para o citosol. O citocromo c ativa caspase-9, formando o complexo apoptossomo que, posteriormente, ativa a caspase-3 (Jiang *et al.*, 2015). Todavia, paralelamente, mecanismos anti-apoptóticos, como o aumento da expressão da proteína Bcl-2, são ativados (Engel e Henshall, 2009; Dericioglu *et al.*, 2013).

Estudos envolvendo mecanismos de apoptose, sobretudo glial, e o papel da mesma na indução e/ou inibição da epileptogênese e ictogênese ainda são incipientes, bem como a sua interação com processos inflamatórios na ELT humana. Entretanto, a análise histopatológica

da EH sugere que há uma forte interação entre morte neuronal e inflamação na ELT, uma vez que, segundo as diretrizes preconizadas pela ILAE, a perda neuronal e a gliose são colocalizadas e devem ser avaliadas em associação para classificação da EH (Blümcke *et al.*, 2013). Além disso, a apoptose parece estar mais associada à epilepsia crônica e farmacorresistente (Uysal *et al.*, 2003; Engel e Henshall, 2009; Nobili *et al.*, 2015).

### **2.2.6 Farmacorresistência**

O objetivo central do tratamento para epilepsia é o controle das crises epiléticas pela utilização de fármacos anticonvulsivantes (Clínico, 2014). Entretanto, cerca de 30% dos pacientes não respondem adequadamente à farmacoterapia (Shorvon e Goodridge, 2013), sendo que, dentre eles, a maioria apresenta ELT. Além disso, muitos pacientes que residem em países em desenvolvimento desconhecem a condição de refratariedade, por falta de devido acompanhamento médico (Mbuba *et al.*, 2008; Schiltz e Vaca, 2018).

Uma pequena porcentagem dos pacientes refratários (4%) pode tornar-se responsiva à farmacoterapia em algum momento da doença. Entretanto, a taxa de recidiva da farmacorresistência entre esses pacientes é um evento frequente. Além disso, o descontrole das crises está relacionado ao aumento do risco de morte prematura (De Oliveira *et al.*, 2011; Devinsky *et al.*, 2016), acidentes e comorbidade psiquiátricas (Isaacs *et al.*, 2004; De Oliveira *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017). Portanto, o diagnóstico de farmacorresistência é essencial ao correto manejo da farmacoterapia, acompanhamento em centros especializados, encaminhamento cirúrgico e redução da mortalidade (González *et al.*, 2015; Gritti *et al.*, 2015).

### **2.2.7 Farmacoterapia na ELT**

A farmacoterapia empregada no tratamento da epilepsia do lobo temporal, bem como em demais tipos de epilepsia, tem por objetivo o controle das crises e consequente melhoria da qualidade de vida dos pacientes. A semiologia das crises, comorbidades presentes e segurança do fármaco são fatores essenciais ao delineamento da farmacoterapia anti-convulsivante (Gritti *et al.*, 2015). Quando o paciente é responsivo ao tratamento

monoterapêutico, este é escolhido em detrimento do politerapêutico, uma vez que aumenta as chances de adesão e reduz a ocorrência de efeitos adversos (Yacubian e Kochen 2014). Entretanto, como a ELT apresenta alta taxa de farmacoresistência, a politerapia é frequentemente utilizada na tentativa de controle das crises. Além do emprego de dois ou mais fármacos, os pacientes com ELT, geralmente, fazem uso de altas doses (Wirrell, 2013).

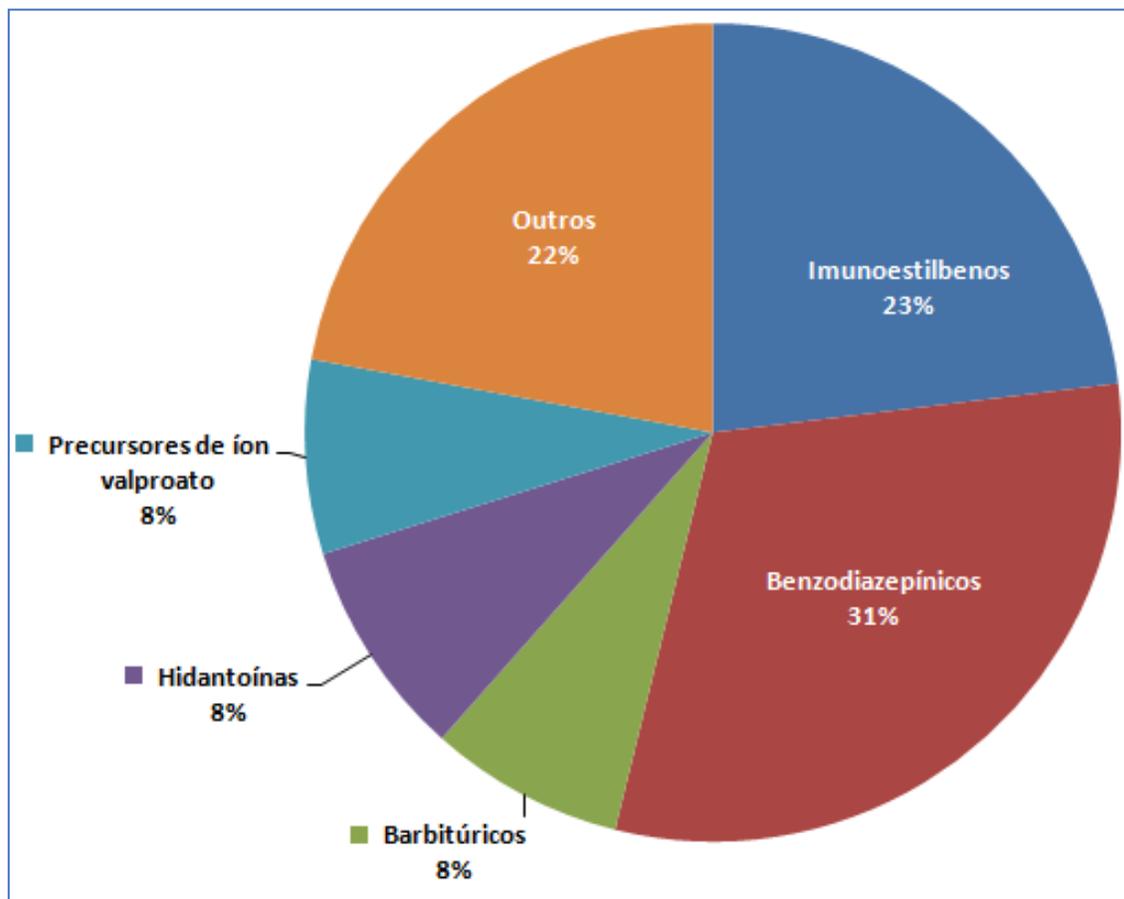
Atualmente, no Brasil, há diversas classes de fármacos anti-convulsivantes preconizadas, sendo as principais os iminoestibenos, benzodiazepínicos, succinidas, hidantoínas, barbitúricos, precursores do valproato e fármacos de terceira geração (por exemplo, topiramato e lamotrigina) (Brasil, 2018). Essas classes atuam basicamente por três mecanismos:

- inibição sináptica mediada pelo aumento do GABA na fenda pré e pós-sináptica;
- inibição canais de íon cálcio voltagem-dependentes;
- bloqueio dos canais de íon sódio voltagem-dependentes (Brunton *et al.*, 2012).

Um estudo envolvendo pacientes com ELT farmacoresistentes acompanhados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) mostrou que a classe dos benzodiazepínicos foi a mais utilizada dentre os pacientes estudados (Figura 4) (Reis *et al.*, 2017). Essa classe é representada por fármacos como clobazam, clonazepam, diazepam, cloxazolam e nitrazepam, e atua aumentando a frequência de abertura dos receptores pós-sinápticos de GABA. Entretanto, ao avaliar qual o fármaco mais empregado, observou-se maior frequência da utilização de carbamazepina (um iminoestibeno) (70% dos pacientes do estudo), seguido por clobazam, clonazepam, lamotrigina e topiramato (Reis *et al.*, 2017).

Os iminoestibenos atuam inibindo os canais de íon sódio voltagem dependentes e, conseqüentemente, os disparos neuronais repetitivos e o fenômeno de hipersincronização. (Brasil, 2018; Brunton *et al.*, 2012). De acordo com o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas brasileiros para o tratamento de epilepsia, a carbamazepina é indicada para o controle de crises focais tanto em monoterapia quanto como fármaco adjuvante (Brasil, 2018). Com relação à lamotrigina e o topiramato, na ELT, têm sido utilizados em combinação com carbamazepina e benzodiazepínicos, predominantemente. A lamotrigina reduz e retarda

a recuperação de canais de Na<sup>+</sup> previamente bloqueados (Brunton *et al.*, 2012). O topiramato atua pela combinação dos três mecanismos citados anteriormente (Brasil, 2018).



**Figura 4 – Classes de fármacos mais utilizados no tratamento de pacientes com ELT farmacorresistente no HC-UFMG.**

ELT: epilepsia do lobo temporal; HC-UFMG: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Fonte: Reis *et al.* (2017)

### **2.2.8 Tratamento cirúrgico: ressecção hipocampal**

A remoção cirúrgica do foco epiléptico tem sido uma opção eficaz para o controle das crises no caso de pacientes farmacorresistentes elegíveis, sobretudo daqueles que apresentam EH. As taxas de remissão de crises são altas (aproximadamente, 70% dos casos após dois anos de acompanhamento e 50% após dez anos). Além disso, a cirurgia propicia redução da dose e, eventualmente, suspensão de fármacos e consequente melhoria da qualidade de vida (Bonelli *et al.*, 2010; Sadek e Gray, 2011; Gritti *et al.*, 2015).

Para ser considerado elegível, o paciente deve ter o diagnóstico de ELT refratária ao tratamento farmacológico, pautado no traçado eletrográfico e na detecção da lateralidade e redução do volume hipocampal por RNM. Ademais, esse paciente deve ser submetido a análises neuropsicológicas para avaliação da preservação da memória declarativa episódica, principalmente da função verbal e visual (Bonelli *et al.*, 2010; Deleo *et al.*, 2016). Dentre os testes empregados na avaliação neuropsicológica, os testes de Memória Lógica e Reprodução Visual, imediata e tardia, são classicamente utilizados. Tais testes fazem parte da Escala de Memória de Wechsler, que tem demonstrado resultados consistentes dentro da população com ELT farmacorresistente (Bouman *et al.*, 2016).

Basicamente, no teste de Memória Lógica, utilizado para avaliação da memória verbal, duas histórias curtas e fictícias são contadas ao paciente, que deve reproduzi-las imediatamente (tempo I) e 30 minutos após a leitura do examinador (tempo II). O número de elementos recordados e a acurácia em reproduzir as histórias determinam o escore final do teste. No caso do teste de Reprodução Visual, o examinador apresenta ao paciente quatro formas geométricas simples, durante 10 segundos. Após esse tempo, o paciente deve reproduzir as formas geométricas em uma folha em branco não pautada, imediatamente (tempo I) e após 30 minutos da exposição das figuras (tempo II). A acurácia ao reproduzir as formas geométricas determina a pontuação final do teste (Corporation, 1997). Caso haja perda considerável da memória verbal e/ou visual, o benefício da cirurgia é questionado, a fim de se manter uma preservação mínima da capacidade cognitiva (Bonelli *et al.*, 2010; Deleo *et al.*, 2016)

A extensão da ressecção também deve ser bem avaliada, já foi demonstrado, por uma combinação entre avaliação psicológica e ressonância magnética funcional, que a função de memória no hipocampo ipsilateral posterior pode contribuir para a preservação da memória após cirurgia de remoção do corpo hipocampal anterior (Bonelli *et al.*, 2010).

Os procedimentos cirúrgicos mais empregados consistem em amigdalohipocampectomia seletiva, com excisão da amígdala e da região anterior do corpo hipocampal, ou combinada

com ressecção da porção anterior do lobo temporal (lobotomia temporal anterior) (Blümcke *et al.*, 2016). Nesses procedimentos, aproximadamente, dois centímetros do corpo do hipocampo são ressecados (Schramm, 2008). Para posterior análise histopatológica, a ressecção em bloco é mais adequada que a excisão fragmentada, pelo fato de preservar a anatomia do fragmento cirúrgico. Nesse contexto, a integração entre o epileptologista, neurocirurgião e neuropatologista é imprescindível para otimização da análise histopatológica (Blümcke *et al.*, 2016; Deleo *et al.*, 2016). Além disso, um bom diagnóstico associado às informações clínicas e dados de exames eletrofisiológicos e neuroimagem aumenta as chances de remissão de crises após a cirurgia (Al Sufiani e Ang, 2012a; Deleo *et al.*, 2016).

A EH é o achado histopatológico mais comumente encontrado nos fragmentos de hipocampo ressecados, porém, achados teciduais podem apresentar mais de um tipo de lesão em uma única ressecção cirúrgica, revelando sua complexidade. Nesse contexto, técnicas histopatológicas desde a coloração por hematoxilina e eosina (H&E) até marcação de proteínas por imuno-histoquímica permitem melhor classificação do tipo de esclerose, compreensão dos mecanismos presentes no foco epiléptico e predição do prognóstico (Al Sufiani e Ang, 2012b; Blümcke *et al.*, 2013; Blümcke *et al.*, 2016; Deleo *et al.*, 2016).

### **2.2.9 Esclerose hipocampal**

A EH é o achado histopatológico mais comum em indivíduos adultos portadores de ELT, sendo encontrada em, aproximadamente, 56 a 70% dos fragmentos cirúrgicos de hipocampo (Novy *et al.*, 2013). A etiologia dessa lesão não é totalmente caracterizada, mas está frequentemente associada a lesões cerebrais extrahipocampais, como malformações corticais e vasculares e, principalmente, secundárias a crises febris (Cendes *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1999; Tassi *et al.*, 2009; Glover *et al.*, 2015). Possivelmente, tumores e displasias corticais focais também podem induzir EH em pacientes com ELT (Piao *et al.*, 2010; Japp *et al.*, 2013). Como se trata de uma lesão frequentemente progressiva, a esclerose gera um processo cíclico, dentro do qual induz crises epilépticas, que, por sua vez, intensificam a lesão no hipocampo e em regiões adjacentes (Walker, 2015). Histologicamente, a EH é caracterizada por perda dos neurônios piramidais da região CA, sobretudo CA1, acompanhada de gliose intensa e

difusa (Blümcke *et al.*, 2013; Thom, 2014). Além disso, em cerca de 50% dos casos, é possível observar alterações no giro denteado, como dispersão dos neurônios granulares e/ou bilaminaridade da camada granular (Blümcke *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2015). A esclerose é responsável por alterações da conectividade neuronal e, clinicamente, contribui para a cronicidade da epilepsia e redução da cognição (Baulac, 2015; Walker, 2015). Estudos clínicos, histopatológicos e de neuroimagem tem associado a EH a um declínio cognitivo crônico (Tai *et al.*, 2017). Nesse contexto, Helmstaedter & Elger (2009) mostraram declínio acelerado de memória em pacientes com ELT em comparação a pacientes não epiléticos. Neste estudo, que envolveu 1000 indivíduos, pacientes com cerca de 60 anos apresentaram desempenho similar a indivíduos não epilético com, aproximadamente, 80 anos em testes de memória visual.

No caso da memória episódica, diversos estudos tem mostrado clara associação da redução da densidade neuronal na região CA em pacientes com EH, tanto em testes de memória verbal, quanto visual, anteriormente à amigdalohipocampectomia (Coras *et al.*, 2014; Allone *et al.*, 2017; Prada Jardim *et al.*, 2018). Entretanto, apesar da gliose ser um componente clássico da EH e induzir a perda neuronal, não há estudos prévios avaliando a relação da mesma com o comprometimento da memória em pacientes com ELT. Além dessa ação indireta da gliose, que, ao exacerbar a neuroinflamação, induz morte neuronal por processos de necrose e apoptose (Walker e Sills, 2012; Devinsky *et al.*, 2013), alterações funcionais e morfológicas de astrócitos e micróglia também prejudicam, diretamente, o equilíbrio dos neurotransmissores e a plasticidade neuronal (Sajja *et al.*, 2016). Micróglia e astrócitos são importantes para a produção de componentes de gliotransmissores, como adenosina e GABA, os quais são importantes para a consolidação da memória de longo prazo (Babayan *et al.*, 2012). Adicionalmente, recentes estudos experimentais em doenças neurodegenerativas associadas a declínio cognitivo rápido e progressivo, como Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e Demências Fronto-temporais, tem mostrado que a micróglia contribui para formação de agregados proteicos, como os compostos por proteína  $\beta$ -amiloide e  $\alpha$ -sinucleína (Heneka *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2017; Ransohoff, 2017).

Dessa forma, é essencial um olhar mais aprofundado da relação gliose-memória e o estudo do hipocampo ressecado é uma excelente maneira de relacionar os mecanismos de alterações teciduais com o quadro clínico dos pacientes com ELT submetidos à cirurgia (Kitaura *et al.*, 2018).

### 2.2.9.1 Classificação histopatológica da esclerose hipocampal

De acordo com a localização da perda neuronal, intensidade da mesma e grau da gliose, a EH pode ser subdividida em três tipos, conforme classificação validada pela ILAE. Com essa classificação, torna-se mais palpável a predição de prognósticos pós-cirúrgicos individuais, resposta ao tratamento farmacológico, grau de funções cognitivas e recorrência de comorbidades psiquiátricas e de alterações comportamentais (Blümcke *et al.*, 2013).

A EH tipo 1 é caracterizada por perda neuronal intensa nas regiões CA1 (superior a 80%) e CA4 (entre 40 e 90%), acompanhada de astrogliose fibrilar difusa. A região CA3 apresenta perda variável e a CA2, mantém-se relativamente preservada (perda de 30 a 50% dos neurônios). O giro denteado sofre alterações mais focais, dentre elas estão a morte de neurônios da camada granular, espalhamento dos neurônios residuais e, eventualmente, reorganização dos mesmos em camada bilaminar (Blumcke *et al.*, 2012; Blümcke *et al.*, 2013; Thom, 2014) (Figura 5A). A esclerose tipo 1 é a lesão mais recorrente na ELT, estando relacionada a um início precoce da doença e uma maior porcentagem de remissão de crises após a ressecção do foco epiléptico (Thom, 2014; Deleo *et al.*, 2016).

Na EH tipo 2, a perda neuronal ocorre predominante na região CA1 (80% dos neurônios), bem como a astrogliose. As demais sub-regiões apresentam densidade de neurônios mais preservada, aproximadamente, 75% da densidade normal (Blümcke *et al.*, 2013) (Figura 5B). Com relação ao giro denteado, a dispersão de neurônios é um achado recorrente, embora não haja perda intensa (Blümcke *et al.*, 2007). A esclerose tipo 2 é considerada atípica, por acometer até 10% dos pacientes com ELT. Em comparação ao tipo 1, está associada a um início mais tardio das crises e apresenta pior prognóstico pós-cirúrgico (Thom, 2014; Deleo *et al.*, 2016). A tipo 3, por sua vez, também é considerada atípica (acometendo 7,5% dos casos, aproximadamente) e compartilha com a tipo 2 as mesmas características com relação

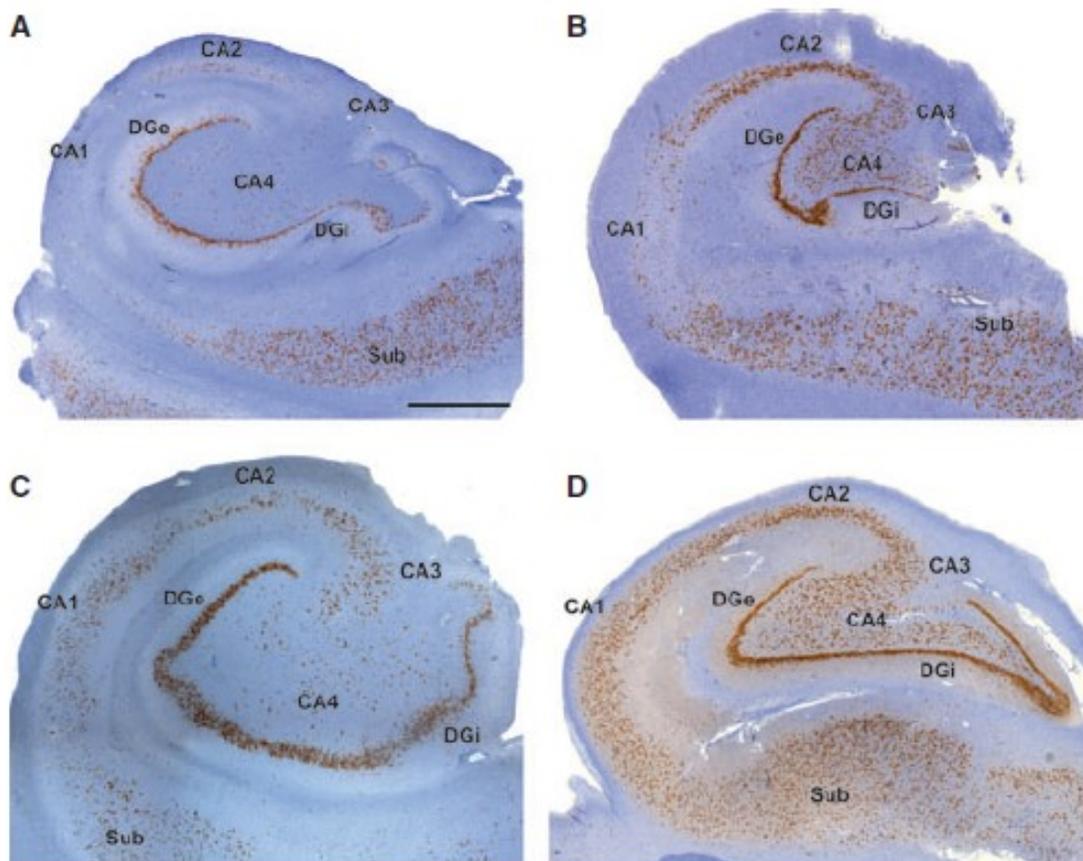
ao início das crises e desfecho pós-cirúrgico (Blümcke *et al.*, 2007; Blümcke *et al.*, 2013; Thom, 2014). A diferença principal entre as duas é que a tipo 3 acomete, predominantemente, a sub-região CA4, enquanto a tipo 2 acomete, principalmente, a região CA1 (Blümcke *et al.*, 2013) (Figura 5C e 5B, respectivamente). Além disso, a EH 3 é mais recorrente em epilepsia que cursa com outras doenças no SNC, como encefalite de Rasmussen, cavernomas e tumores neuroepiteliais disemбриoblásticos (Mathern *et al.*, 1997).

Em alguns casos de ELT, entretanto, esclerose não é encontrada no fragmento pós-cirúrgico ou em peças anatômicas *post-mortem*. Nesse contexto, a ativação de astrócitos é evidente e pode ocorrer morte de células granulares em regiões pontuais do giro denteado, mas não há perda significativa de neurônios piramidais na região CA (Thom *et al.*, 2005; Blümcke *et al.*, 2013) (Figura 5D). Os casos com ausência de esclerose estão associados com início tardio da doença e alta taxa de recidiva de crises após a cirurgia (Thom, 2014).

É importante ressaltar que a localização e padrão de alterações histológicas observadas em amostras de hipocampo provenientes de pacientes com ELT tem apresentado relação com variáveis clínicas (Calderon-Garciduenas *et al.*, 2018; Kitaura *et al.*, 2018), exames de imagem (Malmgren e Thom, 2012), comorbidades psiquiátricas (Kandratavicius *et al.*, 2013; Kandratavicius *et al.*, 2014a; Kandratavicius *et al.*, 2015) e declínio cognitivo (Neves *et al.*, 2012b). Um ponto importante é que, para adequada classificação da EH, o fragmento analisado deve conter, pelo menos, as regiões CA1 e CA4 completas, caso contrário, o diagnóstico do patologista não poderá confirmar a lesão sugerida pelo diagnóstico clínico (Blümcke *et al.*, 2013; Blümcke *et al.*, 2016).

Estudos comparativos entre os tipos de EH são incipientes, principalmente com relação à análise dos mecanismos patofisiológicos, bem como possíveis associações e correlações dos mesmos com parâmetros clínicos. No que diz respeito ao declínio de memória, por exemplo, a associação do mesmo com o tipo de EH ainda não está bem estabelecida. Alguns estudos demonstram que a extensa morte neuronal em todos os subcampos do hipocampo, exceto em CA2, está associada e apresenta correlação com o comprometimento do desempenho dos pacientes nos testes de memória visual e verbal previamente à intervenção cirúrgica (Pauli *et*

*al.*, 2006; Prada Jardim *et al.*, 2018). No entanto, outros estudos sugerem que a intensa morte neuronal na região CA1 não é tão crucial para o declínio da memória episódica quanto na região CA4, indicando um comprometimento maior da memória em pacientes com EH tipo 1 em comparação a pacientes com EH tipo 2 (Blümcke *et al.*, 2009; Stefan *et al.*, 2009).



**Figura 5 – Subclassificação da Esclerose Hipocampal na ELT, segundo os critérios da ILAE.** Estão evidenciadas, de acordo com a distribuição da perda neuronal, a EH tipo 1 (A), tipo 2 (B), tipo 3 (C) e ausência de EH (D) em amostras de hipocampo provenientes de pacientes com ELT. Todas as colorações representam reação imuno-histoquímica anti-proteína nuclear neuronal (NeuN) com contracoloração com hematoxilina. CA: Cornus Ammonis; sub: subculum; DGe: porção externa do giro denteado; DGi: porção interna do giro denteado; ELT: epilepsia do lobo temporal; EH: esclerose hipocampal. Fonte: Blumcke *et al.*, 2013.

### 2.2.9.2 Colorações e marcadores utilizados no diagnóstico histopatológico da esclerose hipocampal

As amostras cirúrgicas, frequentemente, apresentam-se mal orientadas e com tamanho reduzido, o que dificulta ou até mesmo impossibilita a classificação da EH. Nesse sentido, a

utilização de algumas colorações e a imunomarcação de proteínas podem auxiliar na determinação do tipo de esclerose, bem como na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos (Blümcke *et al.*, 2013; Thom, 2014).

A coloração por H&E ou o luxol *fast blue* combinado ao H&E são preconizadas pela ILAE e úteis na detecção da perda neuronal e de alterações morfológicas tanto na região CA quanto no giro denteado. Dentre os imunomarcadores, estão os anticorpos anti-proteína glial ácida (anti-GFAP), anti-proteína nuclear neuronal (anti-NeuN) e anti-cluster de diferenciação 3 (anti-CD3). O GFAP é utilizado para avaliar a ativação de astrócitos e consequente astrogliose nas regiões de perda neuronal; o NeuN possibilita a avaliação da intensidade e localização da perda neuronal nos subcampos hipocampais, sendo essencial à classificação da esclerose; o CD3, apesar de não ser essencial para a classificação proposta pela ILAE, por se tratar de uma proteína específica de linfócitos T, é útil para a detecção de células CD8<sup>+</sup>, sendo utilizado no diagnóstico diferencial para encefalite límbica cursando com EH (Blümcke *et al.*, 2016).

Mesmo não sendo uma célula descrita como trivial para a determinação da esclerose, a micróglia tem papel muito importante no desenvolvimento da neuroinflamação na ELT. Além disso, a microgliose tem sido frequentemente demonstrada na ELT humana e está aumentada em relação a fragmentos de hipocampo *post-mortem* de indivíduos sem doenças neurológicas (Johnson e Kan, 2010; Peixoto-Santos *et al.*, 2012; Kandratavicius *et al.*, 2015; Juarez-Rebollar *et al.*, 2017). O HLA-DR é um marcador útil para a detecção de micróglia ativada, possibilitando a identificação de vários estágios de ativação da mesma, de acordo com a morfologia observada (altamente ramificada: micróglia quiescente, moderadamente hipertrófica: estágio intermediário de ativação, hipertrófica: ativada, altamente hipertrófica: muito ativada). Tanto o HLA-DR quanto o CD68 refletem a ativação microglial como resposta a um dano tecidual no SNC (Hendrickx *et al.*, 2017).

Recentemente, a gliose foi correlacionada positivamente, tanto *in vivo* quanto *ex vivo*, com o tempo de relaxação T2, cujo aumento do sinal na RNM é um importante marcador de EH (Peixoto-Santos e Kandratavicius, 2017). Além disso, também já foi demonstrada a

correlação entre imunomarcção de HLA-DR, duração da epilepsia e frequência de crises anteriormente à cirurgia, em uma coorte de epilepsia secundária à displasia focal (Boer *et al.*, 2006; Ravizza *et al.*, 2008). A análise histopatológica da astromicrogliose na EH também pode ser útil para a predição do desfecho pós-cirúrgico dos pacientes (Blümcke *et al.*, 2013; Thom, 2014).

### *2.2.9.3 Estudos Histopatológicos da ELT no Brasil*

A excisão cirúrgica possibilita o estudo histopatológico da EH presente no foco epiléptico e, conseqüentemente, a elucidação de mecanismos que ocorrem no SNC e que, eventualmente, podem estar associados ou correlacionados com marcadores periféricos e variáveis clínicas. Entretanto, ainda há poucos estudos brasileiros com o objetivo de caracterizar os achados histopatológicos da EH presente em pacientes com ELT em acompanhamento em hospitais referência no Brasil. Outro ponto é que os trabalhos já publicados estão concentrados em poucos centros e a maior parte deles é focada na diferença da expressão de marcadores teciduais entre pacientes com e sem comorbidades psiquiátricas. Ou seja, há uma necessidade da expansão desses estudos para determinar o perfil da EH, sua associação com outros parâmetros clínicos e com o prognóstico pós-cirúrgico dos pacientes, além de avaliar mais marcadores envolvidos na gliose e perda neuronal. A tabela 1 lista trabalhos realizados no Brasil nos últimos 10 anos. A busca por esses trabalhos foi limitada à base *MedLine*. As seguintes palavras-chave foram utilizadas: *temporal lobe epilepsy, hippocampal sclerosis, neuropathology* e *Brazil*. Foram excluídos relatos de caso, artigos de revisão e resumos.

Tabela 1 – Relação de estudos brasileiros contemplando estudo histopatológico de fragmentos hipocampais ressecados de pacientes com ELT farmacorresistente, publicados nos últimos 10 anos e disponíveis na base de dados *MedLine*.

<b>Autor e ano da publicação (Referência)</b>	<b>População estudada</b>	<b>Métodos empregados</b>	<b>Imunomarcadores avaliados</b>
(Bando <i>et al.</i> , 2011)	Não informado	Coloração de Nissl	—
(Jardim <i>et al.</i> , 2012)	Não informado	Coloração com H&E Imuno-histoquímica	NeuN
(Neves <i>et al.</i> , 2012a)	Não informado	Coloração com H&E Imuno-histoquímica	NeuN
(Peixoto-Santos <i>et al.</i> , 2012)	Pacientes com ELT submetidos à remoção do foco epiléptico no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.	Imuno-histoquímica Imunofluorescência	NeuN, GFAP, HLA-DR e MT-I/II GFAP, MT-I/II, MAP2
(Kandratavicius <i>et al.</i> , 2012)	Pacientes com ELT submetidos à remoção do foco epiléptico no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.	Coloração com H&E Coloração de Nissl Coloração de Neo Timm Imuno-histoquímica	NeuN
(Kandratavicius, Monteiro, Assirati Jr, <i>et al.</i> , 2013)	Pacientes com ELT submetidos à remoção do foco epiléptico no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP entre 1996 e 2006.	Coloração de Neo Timm Imuno-histoquímica	NeuN, NGF, BDNF, NT3
(Kandratavicius, Rosa-Neto, <i>et al.</i> , 2013)	Pacientes com ELT submetidos à remoção do foco epiléptico no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.	Coloração de Neo Timm Imuno-histoquímica	NeuN, GFAP, MAP2, mGluR5
(Kandratavicius, Monteiro, Hallak, <i>et al.</i> , 2013)	Pacientes com ELT submetidos à remoção do foco epiléptico no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.	Imuno-histoquímica	NeuN, MAP2, proteína tau total
(Kandratavicius <i>et al.</i> , 2014a)	Pacientes com ELT submetidos à remoção do foco epiléptico no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.	Imuno-histoquímica	NeuN, p75 <sup>NTR</sup> , TrkA, TrkB, TrkC
(Kandratavicius <i>et al.</i> , 2014b)	Pacientes com ELT submetidos à remoção do foco epiléptico no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.	Imuno-histoquímica	NeuN, HSP70, HSP90 alfa e beta
(Kandratavicius <i>et al.</i> , 2015)	Pacientes com ELT submetidos à remoção do foco epiléptico no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.	Imuno-histoquímica	GFAP, HLA-DR, MTI/II, AQP4
(Peixoto-Santos <i>et al.</i> , 2018)	Pacientes com ELT submetidos à remoção do foco epiléptico no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.	Imuno-histoquímica	NeuN
(Toscano <i>et al.</i> , 2019)	Pacientes com ELT submetidos à remoção do foco epiléptico no Hospital das Clínicas da UFMG e do Hospital Felício Rocho – Belo Horizonte.	H&E Imuno-histoquímica	NeuN, GFAP, HLA-DR, Bax, Bcl-2, caspase-3 clivada

USP: Universidade de São Paulo; NeuN: proteína nuclear neuronal, GFAP: proteína ácida fibrilar glial, HLA-DR: antígeno leucocitário humano DR, MTI/II: metalotioneína glial I/II, MAP2: proteína associado a microtúbulo-2, NGF: fator de crescimento neural, BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro, NT3: neurotrofina 3, mGluR5: receptor metabotrópico de glutamato-5, p75<sup>NTR</sup>: receptor de neurotrofina p75, TrkA: receptor tirosina cinase A, TrkB: receptor tirosina cinase B, TrkC: receptor tirosina cinase C, HSP70: proteína de choque térmico 70, HSP90: proteína de choque térmico 90, AQP4: aquaporina 4.

### **3. JUSTIFICATIVA, HIPÓTESE E OBJETIVOS**

Esse trabalho é parte de uma consolidada linha de pesquisa focada no estudo translacional de vias inflamatórias na epilepsia. O grupo responsável por esse estudo tem avaliado diversos marcadores plasmáticos e teciduais em humanos e modelos experimentais de epilepsia (Silveira *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2016; Vilela *et al.*, 2017; De Brito Toscano *et al.*, 2019).

Trabalhar com ELT humana é de suma importância não apenas pela relevância epidemiológica e econômica da doença, mas também pela possibilidade de obtenção de tecido em casos de farmacoresistência e elegibilidade ao procedimento cirúrgico. Poucos trabalhos avaliam alterações histopatológicas, sobretudo alterações gliais, em relação ao quadro clínico dos pacientes. Não há estudos prévios na literatura abordando a relação da gliose presente na EH com os déficits de memória apresentados pelos pacientes com ELT farmacoresistente. Além disso, a investigação do balanço entre sinais anti e pró-apoptóticos na EH é bastante incipiente e não há estudos analisando a atuação da via intrínseca da apoptose, separadamente, em neurônios piramidais, neurônios granulares e células da glia. Assim, esse trabalho poderá contribuir para um aprofundamento do entendimento dos mecanismos de morte celular e inflamação envolvidos na fisiopatologia da ELT e a possível associação dos mesmos com parâmetros clínicos importante, como o declínio de memória episódica (principal comorbidade cognitiva na ELT), bem como para a identificação de potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico.

#### **3.1 HIPÓTESE**

A via intrínseca da apoptose está envolvida na progressão da EH e atua de maneira diferenciada em neurônios piramidais, neurônios granulares e células da glia. Acredita-se que a apoptose de células gliais está associada à gliose e à perda neuronal, que, ciclicamente, induzem mais apoptose glial. Além da morte neuronal, essa gliose exacerbada também pode estar associada ao declínio de memória verbal e visual apresentado por pacientes com ELT.

### 3.2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo consiste em caracterizar as alterações histopatológicas, classificar a EH e identificar mecanismos de morte celular e gliose na porção anterior do hipocampo, proveniente de pacientes com ELT farmacorresistente, cursando com EH, e submetidos à ressecção cirúrgica. Além de buscar associações dessas alterações com variáveis clínicas.

Os objetivos específicos foram:

- a. Investigar e quantificar marcadores pró e anti-apoptóticos da via intrínseca em hipocampos com EH, comparando os com hipocampos controles.
- b. Quantificar marcadores de astrogliose em hipocampos com EH, comparando os com hipocampos controles.
- c. Investigar se há associação entre parâmetros morfométricos e dados clínicos, sobretudo declínio da memória verbal e visual nos pacientes com ELT associada à EH.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

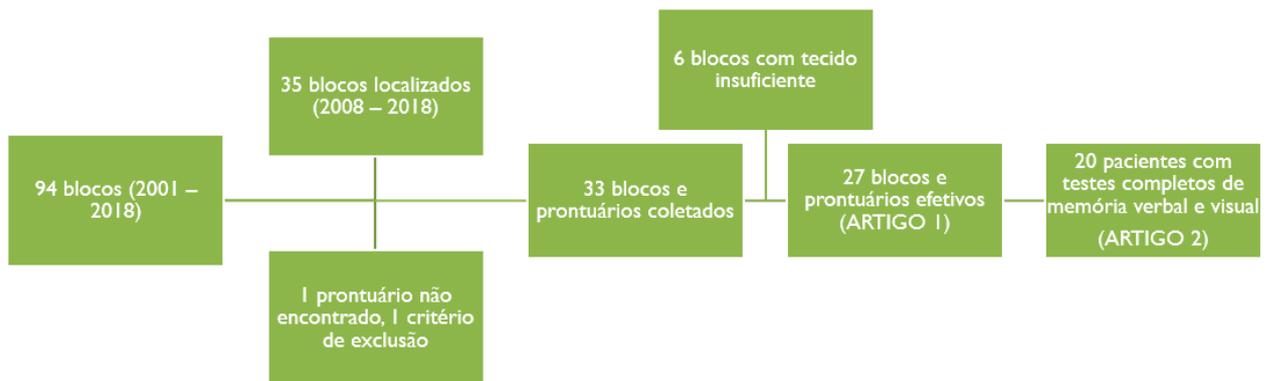
### **4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA**

Este foi um estudo retrospectivo observacional, envolvendo a caracterização de alterações histopatológicas, a avaliação de marcadores por imuno-histoquímica, e associação dos resultados com a performance nos testes de Memória Lógica e Reprodução Visual e outros dados clínicos dos respectivos pacientes, provenientes do HC-UFMG e do Núcleo Avançado de Tratamento das Epilepsias (NATE) do Hospital Felício Rocho, ambos referência em tratamento de epilepsia em Minas Gerais.

Os pacientes assinaram um termo de Consentimento Livre Esclarecido (ANEXO1), concordando em participar da pesquisa e ceder parte do fragmento cirúrgico de hipocampo esclerótico. Foram obtidos blocos parafinados contendo fragmentos hipocampais de indivíduos operados entre os anos de 2008 a 2018. Esses blocos foram disponibilizados pelo Departamento de Anatomia Patológica dos referidos hospitais. Foram obtidos, inicialmente, 97 blocos, dos quais, obedecendo os critérios de inclusão e exclusão descritos a seguir, 27 foram considerados elegíveis (utilizados no artigo 1). Desses 27 blocos, 20 casos apresentaram avaliação neuropsicológica contendo os testes de Memória Lógica e Reprodução Visual (utilizados no artigo 2), conforme ilustrado pela Figura 6.

Os seguintes critérios de inclusão foram adotados: idade superior a 18 anos, diagnóstico clínico de ELT baseado na semiologia das crises, traçados eletrográficos ictais/interictais e exames de neuroimagem (RNM), e indicação cirúrgica para remoção do foco epiléptico. Foram excluídos do estudo pacientes com idade inferior a 18 anos, portadores de outra doença neurológica (tais como demência ou AVC) e de doença psiquiátrica grave, de neoplasia maligna, insuficiência renal ou hepática, sob uso de medicação imunomoduladora nas últimas seis semanas antes da cirurgia, que passaram por cirurgia ou trauma extenso no último mês e os que não consentiram participar do estudo. Com relação às amostras de hipocampo esclerótico, incluiu-se todas as que apresentaram as regiões CA1, CA4 e o giro denteados completos, condição necessária para a detecção de EH.

No caso dos hipocampos controles, 20 amostras *post-mortem* de indivíduos não epiléticos, pareados por sexo e idade, foram fornecidos pelo *Biobank for Aging Studies* da Universidade de São Paulo (USP) (Grinberg *et al.*, 2007). As amostras controle foram obtidas por necropsias (até 24 horas após a morte), provenientes de 13 homens e sete mulheres, e analisadas da mesma maneira que as amostras cirúrgicas. As causas de morte foram cardiomiopatia, hemopericárdio, edema pulmonar e tromboembolismo pulmonar. Os critérios de exclusão foram histórico de doenças neurológicas, anormalidades histológicas no hipocampo e ausência de parte das regiões CA1, CA4 e/ou giro denteado. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, sob o protocolo 1.939.783 (ANEXO 2).



**Figura 6 – Fluxograma de seleção de blocos parafinados contendo hipocampo escleróticos utilizados.**

## 4.2 AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA VERBAL E VISUAL

Para avaliar o desempenho da memória verbal e visual (capacidade de aquisição e consolidação) antes da ressecção do hipocampo, os pacientes foram submetidos aos testes de Memória Lógica I (memória imediata) e II (recordação após 30 minutos) e Reprodução Visual I (memória imediata) e II (recordação após 30 minutos), que fazem parte da Escala de Memória Wechsler (Wechsler, 1945; 1987). Esses testes foram aplicados pela neuropsicóloga do ambulatório de epilepsia do HC-UFMG. Os valores absolutos dos escores dos testes de memória foram distribuídos de acordo com o número de elementos e o grau de detalhes que os pacientes conseguiram recordar. Esses valores foram corrigidos pela idade e expressos como escore z. Segundo dados normativos, o escore z (corrigido pela idade) igual ou inferior a -0,7 (percentil 25) define um desempenho abaixo da média da população saudável (Wechsler, 1987; Strauss *et al.*, 2006). Portanto, esse

valor foi utilizado como ponto de corte para classificação de pacientes acima ou abaixo da média nos respectivos testes.

### 4.3 COLETA DE DADOS DE CLÍNICOS

Foram coletados, diretamente dos prontuários, dados sobre as características sociodemográficas dos pacientes (idade, sexo, escolaridade, estado civil, profissão), diagnóstico, calendário das crises, tempo de diagnóstico, história pregressa e familiar, dados sobre os medicamentos em uso (posologia, efeitos adversos, farmacoresistência) e presença de comorbidades.

### 4.4 HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os blocos parafinados disponibilizados pelos Departamentos de Anatomia Patológica foram cortados e processados em micrótomo em secções de 4 µm e, posteriormente, submetidos à coloração H&E, para caracterização de lesões teciduais e detecção de EH. Além disso, foram realizadas reações imuno-histoquímicas para marcação de NeuN, GFAP, HLA-DR, Bax, Bcl-2 e caspase-3 clivada. As secções foram montadas em lâminas silanizadas Starfrost (Knittel Glass, Brunsvique, Alemanha) e, posteriormente, desparafinadas e hidratadas, segundo protocolo padrão. Realizou-se recuperação antigênica, por meio de exposição das lâminas, em solução de ácido cítrico 0,05%, ao calor úmido e pressão; bloqueio das peroxidases endógenas em solução de peróxido de hidrogênio (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Spring Bioscience, Pleasanton, EUA) por 15 minutos em câmara escura; bloqueio de epítomos inespecíficos com solução de proteína sérica bovina 0,5% e caseína 5% (Spring Bioscience), por 10 minutos. Em seguida, as secções histológicas foram incubadas *overnight*, em câmara úmida e escura, com o anticorpo primário contra os marcadores listados a seguir:

- NeuN: anticorpo policlonal produzido em coelho (ab104225, diluição 1:3000; Abcam, Cambridge, UK).
- GFAP: anticorpo monoclonal produzido em camundongo (MOB064, clone GA5, diluição 1:200; Diagnostic BioSystem; Pleasanton, EUA).
- HLA-DR: anticorpo monoclonal produzido em camundongo (ab20181, clone TAL1B5, diluição 1:5000; Abcam, Cambridge, UK).

- Bax: anticorpo policlonal produzido em coelho (sc-526, diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA).
- Bcl-2: anticorpo policlonal produzido em coelho (sc-492, diluição 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA).
- Caspase-3 clivada: anticorpo monoclonal produzido em coelho (9661, clone Asp 175, diluição 1:500, Cell Signaling Technology, Danvers, EUA).

Após este período, o anticorpo secundário conjugado à enzima *horseradish peroxidase* (HRP) foi adicionado aos cortes por 15 minutos. As reações foram reveladas com o cromógeno 3-3' diaminobenzina peroxidase (DAB), lavadas em água corrente por 10 minutos e contracoradas com hematoxilina.

#### 4.5 CLASSIFICAÇÃO DA ESCLEROSE HIPOCAMPAL

A EH foi caracterizada de acordo com o Sistema de Classificação da ILAE (Blümcke *et al.*, 2013; Thom, 2014). Foi realizada análise microscópica semiquantitativa das secções de hipocampos escleróticos, utilizando lâminas contracoradas com hematoxilina e eosina, e que foram submetidas à reação imuno-histoquímica para marcação de GFAP e NeuN. Apenas amostras incluindo a região CA completa foram analisadas. Um sistema de pontuação baseado na perda neuronal (coloração NeuN) para subcampos CA (CA1-CA4) e padrão de imunocoloração GFAP foi aplicado, conforme padronizado pelo ILAE (Blümcke *et al.*, 2013). O escore foi: 0 = sem perda neuronal óbvia ou astrogliose moderada; 1 = perda neuronal moderada e astrogliose; 2 = perda neuronal grave e astrogliose fibrilar. O giro denteado também foi avaliado: 0 = camada celular granular normal, 1 = dispersão generalizada ou focal da camada celular granular, 2 = perda celular granular generalizada ou grave. Quando as amostras apresentaram dispersão e duplicação, foram classificadas no subgrupo de duplicação (Calderon-Garciduenas *et al.*, 2018). Dois observadores cegos realizaram a classificação, utilizando um microscópio de múltiplas cabeças.

#### 4.6 MORFOMETRIA DIGITAL

Finalizada a imuno-histoquímica, a área de imunomarcação para GFAP, HLA-DR, Bax e Bcl-2 foi mensurada por análise morfométrica, utilizando o software KS300 (Carl Zeiss,

Oberkochen, Alemanha). Para quantificar essa área, 20 campos para GFAP, Bax e Bcl-2 (aumento de 200x) e 10 campos para HLA-DR (aumento de 400x) foram digitalizados usando uma microcâmara Samsung SDC 415 (Seoul, SKO). Além disso, a intensidade da coloração HLA-DR foi avaliada pelo cálculo da densidade óptica (DO). Para o cálculo da densidade óptica, pelo menos 100 células positivas para HLA-DR foram analisadas aleatoriamente. A DO foi obtida pela razão entre a luz transmitida da área analisada (I) e a luz incidente no comprimento de onda de 500 nm ( $I_0$ ), de acordo com a lei de Beer:  $DO = -\log I / I_0$ . Os valores de brilho na faixa de 0 a 125 foram utilizados no analisador de imagens. Após a calibração, o valor de  $I_0$  foi igual a 181 e os valores de DO, expressos em unidades de cinzas.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0® (San Diego, EUA). Todos os resultados foram submetidos aos testes de *outliers* e normalidade (teste de Shapiro-Wilker). Aos resultados que assumirem distribuição não-paramétrica, foi aplicado o teste de Mann-Whitney; aos que assumirem distribuição normal, foi aplicado o teste *t-student*. A correlação entre os instrumentos de medida foi realizada por meio do Coeficiente de Pearson (r) ou pelo Coeficiente de Correlação de Spearman (rs) em dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N. J.; FRIEDMAN, A. Overview and introduction: The blood–brain barrier in health and disease. **Epilepsia**, v. 53, n. 0 6, p. 1-6, 2012. ISSN 0013-9580 (Print).
- ABIB, C. R. *et al.* Prevalence of seizures and associated factors in children under five living in a deprived municipality of southern Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 65, n. 3A, p. 581-586, 2007. ISSN 0004-282X.
- AL SUFIANI, F.; ANG, L. C. Neuropathology of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy research and treatment**, v. 2012, 2012a. ISSN 2090-1348.
- AL SUFIANI, F.; ANG, L. C. Neuropathology of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research Treatment**, v. 2012, p. 624519, 2012b. ISSN 2090-1356 (Electronic).
- ALLONE, C. *et al.* Neuroimaging and cognitive functions in temporal lobe epilepsy: A review of the literature. **Journal of the neurological sciences**, v. 381, p. 7-15, 2017. ISSN 0022-510X.
- BABAYAN, A. H. *et al.* Integrin dynamics produce a delayed stage of long-term potentiation and memory consolidation. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 37, p. 12854-12861, 2012. ISSN 0270-6474.
- BALOSSO, S. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 6, p. 804-12, 2005. ISSN 0364-5134 (Print).
- BANDO, S. Y. *et al.* Hippocampal CA3 transcriptome signature correlates with initial precipitating injury in refractory mesial temporal lobe epilepsy. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26268, 2011. ISSN 1932-6203.
- BARKER-HALISKI, M.; WHITE, H. S. Glutamatergic mechanisms associated with seizures and epilepsy. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, p. a022863, 2015. ISSN 2157-1422.
- BAULAC, M. MTLE with hippocampal sclerosis in adult as a syndrome. **Revue Neurologique (Paris)**, v. 171, n. 3, p. 259-66, 2015. ISSN 0035-3787.
- BEDNER, P. *et al.* Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. **Brain**, v. 138, n. 5, p. 1208-1222, 2015. ISSN 1460-2156.
- BEGLEY, C. E.; DURGIN, T. L. The direct cost of epilepsy in the United States: a systematic review of estimates. **Epilepsia**, v. 56, n. 9, p. 1376-1387, 2015. ISSN 0013-9580.
- BELL, B. *et al.* The neurobiology of cognitive disorders in temporal lobe epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 3, p. 154, 2011. ISSN 1759-4766.
- BENNETT, M. *et al.* The GluR2 hypothesis: Ca<sup>++</sup>-permeable AMPA receptors in delayed neurodegeneration. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, 1996, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. p.373-384.
- BLÜMCKE, I. *et al.* International recommendation for a comprehensive neuropathologic workup of epilepsy surgery brain tissue: a consensus Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. **Epilepsia**, v. 57, n. 3, p. 348-358, 2016. ISSN 0013-9580.
- BLUMCKE, I. *et al.* Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Brain Pathology**, v. 22, n. 3, p. 402-11, 2012. ISSN 1015-6305.

BLÜMCKE, I. *et al.* Towards a clinico-pathological classification of granule cell dispersion in human mesial temporal lobe epilepsies. **Acta neuropathologica**, v. 117, n. 5, p. 535, 2009. ISSN 0001-6322.

BLÜMCKE, I. *et al.* A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. **Acta Neuropathologica**, v. 113, n. 3, p. 235-44, 2007. ISSN 0001-6322.

BLÜMCKE, I. *et al.* International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. **Epilepsia**, v. 54, n. 7, p. 1315-1329, 2013. ISSN 1528-1167.

BOER, K. *et al.* Evidence of activated microglia in focal cortical dysplasia. **Journal of Neuroimmunology**, v. 173, n. 1, p. 188-195, 2006. ISSN 0165-5728.

BONELLI, S. B. *et al.* Imaging memory in temporal lobe epilepsy: predicting the effects of temporal lobe resection. **Brain**, v. 133, n. Pt 4, p. 1186-99, 2010. ISSN 1460-2156.

BORGES, M. A. *et al.* Urban prevalence of epilepsy: populational study in Sao Jose do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 62, n. 2A, p. 199-204, 2004. ISSN 0004-282X.

BOUMAN, Z. *et al.* Clinical utility of the Wechsler Memory Scale—Fourth Edition (WMS-IV) in patients with intractable temporal lobe epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 55, p. 178-182, 2016. ISSN 1525-5050.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas: epilepsia. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BROUGHTON, B. R.; REUTENS, D. C.; SOBEY, C. G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. **Stroke**, v. 40, n. 5, p. e331-e339, 2009. ISSN 0039-2499.

CALDERON-GARCIDUENAS, A. L. *et al.* New clinicopathological associations and histoprogenic markers in ILAE types of hippocampal sclerosis. **Brain Pathology**, 24 2018. ISSN 1015-6305.

CARPIO, A.; HAUSER, W. A. Epilepsy in the developing world. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 9, n. 4, p. 319-326, 2009. ISSN 1528-4042.

CENDES, F. *et al.* Frequency and characteristics of dual pathology in patients with lesional epilepsy. **Neurology**, v. 45, n. 11, p. 2058-2064, 1995.

CENDES, F. *et al.* Familial temporal lobe epilepsies. **Epilepsy—A Comprehensive Textbook**, p. 2487-2494, 2008.

CHOI, J. *et al.* Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. **Journal of Neuroinflammation**, v. 6, n. 1, p. 38, 2009/12/19 2009. ISSN 1742-2094.

CLÍNICO, P. Diretrizes Terapêuticas—Epilepsia. **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria**, n. 1.319, 2014.

COCKERELL, O. C. *et al.* The cost of epilepsy in the United Kingdom: an estimation based on the results of two population-based studies. **Epilepsy research**, v. 18, n. 3, p. 249-260, 1994. ISSN 0920-1211.

COMPER, S. M. *et al.* Impact of hippocampal subfield histopathology in episodic memory impairment in mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. **Epilepsy & Behavior**, v. 75, p. 183-189, 2017. ISSN 1525-5050.

CORAS, R. *et al.* Differential influence of hippocampal subfields to memory formation: insights from patients with temporal lobe epilepsy. **Brain**, v. 137, n. 7, p. 1945-1957, 2014. ISSN 1460-2156.

CORPORATION, P. **WAIS-III and WMS-III Technical Manual**. Psychological Corporation, 1997. ISBN 0158981049.

CROMPTON, D. E. *et al.* Familial mesial temporal lobe epilepsy: a benign epilepsy syndrome showing complex inheritance. **Brain**, v. 133, n. 11, p. 3221-3231, 2010. ISSN 1460-2156.

CURIA, G. *et al.* Pathophysiology of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? **Current medicinal chemistry**, v. 21, p. 663, 2014.

DATA, S. Ministério da Saúde-Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). **Taxa mortalidade por ano processamento segundo lista morbidade CID-10.[Internet]. Brasil**, 2015.

DATA, S. Ministério da Saúde-Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). **Taxa mortalidade por ano processamento segundo lista morbidade CID-10.[Internet]. Brasil**, 2016.

DE BRITO TOSCANO, E. C. *et al.* Circulating levels of adipokines are altered in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 90, p. 137-141, 2019. ISSN 1525-5050.

DE LANEROLLE, N. *et al.* Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. **Brain research**, v. 495, n. 2, p. 387-395, 1989. ISSN 0006-8993.

DE OLIVEIRA, G. N. M. *et al.* Suicidality in temporal lobe epilepsy: measuring the weight of impulsivity and depression. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 4, p. 745-749, 2011. ISSN 1525-5050.

DE OLIVEIRA, G. N. M. *et al.* Psychiatric disorders in temporal lobe epilepsy: an overview from a tertiary service in Brazil. **Seizure-European Journal of Epilepsy**, v. 19, n. 8, p. 479-484, 2010. ISSN 1059-1311.

DE SIMONI, M. G. *et al.* Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 2623-2633, 2000. ISSN 1460-9568.

DELEO, F. *et al.* Short-and long-term surgical outcomes of temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis: relationships with neuropathology. **Epilepsia**, v. 57, n. 2, p. 306-315, 2016. ISSN 0013-9580.

DELOREY, T. M.; OLSEN, R. W. GABA and epileptogenesis: comparing gabrb3 gene-deficient mice with Angelman syndrome in man. **Epilepsy research**, v. 36, n. 2-3, p. 123-132, 1999. ISSN 0920-1211.

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, 2013. ISSN 1873-7544.

DEVINSKY, O. *et al.* Sudden unexpected death in epilepsy: epidemiology, mechanisms, and prevention. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 10, p. 1075-1088, 2016. ISSN 1474-4422.

DEVINSKY, O. *et al.* Glia and epilepsy: excitability and inflammation. **Trends in neurosciences**, v. 36, n. 3, p. 174-184, 2013. ISSN 0166-2236.

EID, T. *et al.* Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. **The Lancet**, v. 363, n. 9402, p. 28-37, 2004. ISSN 0140-6736.

ENGEL, J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 6, p. 796-803, 2001. ISSN 1528-1167.

ENGEL, J. **Seizures and epilepsy**. Oxford University Press, 2013. ISBN 019532854X.

ENGEL, J. *et al.* Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial. **Jama**, v. 307, n. 9, p. 922-930, 2012. ISSN 0098-7484.

ENGEL JR, J. Outcome with respect to epileptic seizures. **Surgical treatment of the epilepsies**, p. 609-621, 1993.

ENGEL JR, J. Introduction to temporal lobe epilepsy. **Epilepsy research**, v. 26, n. 1, p. 141-150, 1996. ISSN 0920-1211.

ENGEL, T.; HENSHALL, D. C. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 97, 2009.

EPILEPSIES, P. F. R. C. O.; SYNDROMES, E. Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v. 30, n. 4, p. 389-399, 1989.

FALCO-WALTER, J. J.; SCHEFFER, I. E.; FISHER, R. S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. **Epilepsy research**, 2017. ISSN 0920-1211.

FELLIN, T. *et al.* Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. **Neuron**, v. 43, n. 5, p. 729-43, 2004. ISSN 0896-6273.

FERRARI, C. C. *et al.* Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain. **The American journal of pathology**, v. 165, n. 5, p. 1827-1837, 2004. ISSN 0002-9440.

FERREIRA, J. P. **Pediatria: Diagnósticos e Tratamento**. Artmed Editora, 2009. ISBN 8536313528.

FIEST, K. M. *et al.* Prevalence and incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis of international studies. **Neurology**, v. 88, n. 3, p. 296-303, 2017. ISSN 0028-3878.

FISHER, R. S. The new classification of seizures by the International League Against Epilepsy 2017. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 17, n. 6, p. 48, 2017a. ISSN 1528-4042.

FISHER, R. S. An overview of the 2017 ILAE operational classification of seizure types. **Epilepsy & Behavior**, v. 70, p. 271-273, 2017b. ISSN 1525-5050.

- FISHER, R. S. *et al.* ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-482, 2014. ISSN 0013-9580.
- 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. 470-472, 2005. ISSN 1528-1167.
- FISHER, R. S. *et al.* Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 531-542, 2017. ISSN 0013-9580.
- FOX, R.; AUBERT, M. Flow cytometric detection of activated caspase-3. In: (Ed.). **Apoptosis and Cancer**: Springer, 2008. p.47-56. ISSN 1588294579.
- FRENCH, J. *et al.* Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 34, n. 6, p. 774-780, 1993. ISSN 0364-5134.
- GENCPINAR, P. *et al.* The risk of subsequent epilepsy in children with febrile seizure after 5 years of age. **Seizure**, v. 53, p. 62-65, Dec 2017. ISSN 1059-1311.
- GLOVER, R. L. *et al.* ILAE type 3 hippocampal sclerosis in patients with anti-GAD-related epilepsy. **Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm**, v. 2, n. 4, p. e122, 2015. ISSN 2332-7812.
- GOMES, M. D. M. *et al.* A house-to-house survey of epileptic seizures in an urban community of Rio de Janeiro, Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 60, n. 3B, p. 708-711, 2002. ISSN 0004-282X.
- GONZÁLEZ, F. L. *et al.* Epilepsia resistente a fármacos. Concepto y alternativas terapéuticas. **Neurología**, v. 30, n. 7, p. 439-446, 2015. ISSN 0213-4853.
- GRINBERG, L. T. *et al.* Brain bank of the Brazilian aging brain study group—a milestone reached and more than 1,600 collected brains. **Cell and tissue banking**, v. 8, n. 2, p. 151-162, 2007. ISSN 1573-6814.
- GRITTI, C. C. *et al.* Desempenho ocupacional, qualidade de vida e adesão ao tratamento de pacientes com epilepsia. **Revista de Terapia Ocupacional da Universidade de São Paulo**, v. 26, n. 1, p. 93-101, 2015. ISSN 2238-6149.
- HAUSER, W. A. Prevention of post-traumatic epilepsy. **New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 8, p. 540-542, 1990. ISSN 0028-4793.
- HEANEY, D. Epilepsy at work: evaluating the cost of epilepsy in the workplace. **Epilepsia**, v. 40, p. 44-47, 1999. ISSN 0013-9580.
- HELMSTAEDTER, C. Effects of chronic epilepsy on declarative memory systems. In: (Ed.). **Progress in brain research**: Elsevier, v.135, 2002. p.439-453. ISBN 0079-6123.
- HELMSTAEDTER, C.; ELGER, C. Chronic temporal lobe epilepsy: a neurodevelopmental or progressively dementing disease? **Brain**, v. 132, n. 10, p. 2822-2830, 2009. ISSN 1460-2156.
- HENDRICKX, D. A. E. *et al.* Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. **Journal Neuroimmunology**, v. 309, p. 12-22, 2017. ISSN 0165-5728.

- HENEKA, M. T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388-405, 2015. ISSN 1474-4422.
- 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, 2000. ISSN 0028-3878.
- HENSHALL, D. C.; SIMON, R. P. Epilepsy and apoptosis pathways. **Journal Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 25, n. 12, p. 1557-72, 2005. ISSN 0271-678X.
- HERMANN, B. P. *et al.* Cognitive prognosis in chronic temporal lobe epilepsy. **Annals of neurology**, v. 60, n. 1, p. 80-87, 2006. ISSN 0364-5134.
- HINTERKEUSER, S. *et al.* Astrocytes in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy display changes in potassium conductances. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 6, p. 2087-2096, 2000. ISSN 1460-9568.
- IORI, V.; FRIGERIO, F.; VEZZANI, A. Modulation of neuronal excitability by immune mediators in epilepsy. **Current opinion in pharmacology**, v. 26, p. 118-123, 2016. ISSN 1471-4892.
- ISAACS, K. L. *et al.* Obsessive-compulsive symptoms in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 5, n. 4, p. 569-574, 2004. ISSN 1525-5050.
- JAPP, A.; GIELEN, G. H.; BECKER, A. J. Recent aspects of classification and epidemiology of epilepsy-associated tumors. **Epilepsia**, v. 54 Suppl 9, p. 5-11, 2013. ISSN 0013-9580.
- JARDIM, A. P. *et al.* Temporal lobe epilepsy with mesial temporal sclerosis: hippocampal neuronal loss as a predictor of surgical outcome. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 70, n. 5, p. 319-24, 2012. ISSN 0004-282x.
- JIANG, Z. *et al.* The effects of methylene blue on autophagy and apoptosis in MRI-defined normal tissue, ischemic penumbra and ischemic core. **PLoS one**, v. 10, n. 6, p. e0131929, 2015. ISSN 1932-6203.
- JIN, S. H.; JEONG, W.; CHUNG, C. K. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is a network disorder with altered cortical hubs. **Epilepsia**, v. 56, n. 5, p. 772-9, 2015. ISSN 0013-9580.
- JOHNSON, E.; KAN, R. The acute phase response and soman-induced status epilepticus: temporal and regional changes in rat brain cytokine concentrations. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 40, p. 1-9, 2010.
- JUAREZ-REBOLLAR, D. *et al.* Immunohistochemical study of Metallothionein in patients with temporal lobe epilepsy. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 39, p. 87-90, 2017. ISSN 0967-5868.
- KALOGERIS, T. *et al.* Cell biology of ischemia/reperfusion injury. **International Review of Cell Molecular Biology**, v. 298, p. 229-317, 2012. ISSN 1937-6448.
- KANDRATAVICIUS, L. *et al.* Neurotrophin receptors expression in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities and their relation with seizure type and surgical outcome. **Acta Neuropathologica Commun**, v. 2, p. 81, 2014a. ISSN 2051-5960.

- KANDRATAVICIUS, L. *et al.* Hippocampal expression of heat shock proteins in mesial temporal lobe epilepsy with psychiatric comorbidities and their relation to seizure outcome. **Epilepsia**, v. 55, n. 11, p. 1834-1843, 2014b. ISSN 00139580.
- KANDRATAVICIUS, L. *et al.* Differential aberrant sprouting in temporal lobe epilepsy with psychiatric co-morbidities. **Psychiatry Research**, v. 195, n. 3, p. 144-50, 2012. ISSN 0165-1781.
- KANDRATAVICIUS, L. *et al.* Neurotrophins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 72, n. 11, p. 1029-1042, 2013. ISSN 0022-3069.
- KANDRATAVICIUS, L. *et al.* Microtubule-associated proteins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities and their relation with granular cell layer dispersion. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 960126, 2013. ISSN 2314-6141.
- KANDRATAVICIUS, L. *et al.* Mesial temporal lobe epilepsy with psychiatric comorbidities: a place for differential neuroinflammatory interplay. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, p. 38, 2015. ISSN 1742-2094.
- KANDRATAVICIUS, L. *et al.* Distinct increased metabotropic glutamate receptor type 5 (mGluR5) in temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis. **Hippocampus**, v. 23, n. 12, p. 1212-30, 2013. ISSN 1098-1063.
- KANEMOTO, K. *et al.* Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. **Annals of Neurology**, v. 47, n. 5, p. 571-4, 2000. ISSN 0364-5134.
- KANKOWSKI, S. *et al.* A novel RNA editing sensor tool and a specific agonist determine neuronal protein expression of RNA-edited glycine receptors and identify a genomic APOBEC1 dimorphism as a new genetic risk factor of epilepsy. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 10, p. 439, 2018. ISSN 1662-5099.
- KASSNER, A.; MERALI, Z. Assessment of Blood–Brain Barrier Disruption in Stroke. **Stroke**, v. 46, n. 11, p. 3310-3315, 2015. ISSN 0039-2499.
- KAUR, K. *et al.* Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. **Journal of Neurological Science**, v. 381, p. 308-314, 2017. ISSN 0022-510x.
- KITAURA, H. *et al.* Pathophysiological Characteristics Associated With Epileptogenesis in Human Hippocampal Sclerosis. **EBioMedicine**, v. 29, p. 38-46, 2018. ISSN 2352-3964.
- KLEIN, P. *et al.* Commonalities in epileptogenic processes from different acute brain insults: Do they translate? **Epilepsia**, v. 59, n. 1, p. 37-66, 2018. ISSN 0013-9580.
- KOBAYASHI, E.; GUERREIRO, C. A.; CENDES, F. Late onset temporal lobe epilepsy with MRI evidence of mesial temporal sclerosis following acute neurocysticercosis: case report. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 59, n. 2A, p. 255-258, 2001. ISSN 0004-282X.
- LE, D. A. *et al.* Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 23, p. 15188-15193, 2002. ISSN 0027-8424.
- LEAL, B. *et al.* Brain expression of inflammatory mediators in Mesial Temporal Lobe Epilepsy patients. **Journal of neuroimmunology**, v. 313, p. 82-88, 2017. ISSN 0165-5728.

LI, L. M. *et al.* Surgical outcome in patients with epilepsy and dual pathology. **Brain**, v. 122, n. 5, p. 799-805, 1999. ISSN 0006-8950.

LOPES, F. A.; JUNIOR, D. Tratado de pediatria–Sociedade Brasileira de Pediatria. **São Paulo: Monole**, 2007.

MALMGREN, K.; THOM, M. Hippocampal sclerosis--origins and imaging. **Epilepsia**, v. 53 Suppl 4, p. 19-33, 2012. ISSN 0013-9580.

MANSOURI, A. *et al.* Bridging the gap between evidence and practice for adults with medically refractory temporal lobe epilepsy: is a change in funding policy needed to stimulate a shift in practice? **Epilepsy research and treatment**, v. 2015, 2015. ISSN 2090-1348.

MARCHI, N.; GRANATA, T.; JANIGRO, D. Inflammatory pathways of seizure disorders. **Trends in neurosciences**, v. 37, n. 2, p. 55-65, 2014. ISSN 0166-2236.

MARINO JR, R.; CUKIERT, A.; PINHO, E. Epidemiological aspects of epilepsy in São Paulo, Brazil: a prevalence rate study. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 44, n. 3, p. 243-254, 1986. ISSN 0004-282X.

MATHERN, G. W. *et al.* Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. **Journal of Neuropathology Experimental Neurology**, v. 56, n. 2, p. 199-212, 1997. ISSN 0022-3069.

MBUBA, C. K.; NEWTON, C. R. Packages of care for epilepsy in low-and middle-income countries. **PLoS medicine**, v. 6, n. 10, p. e1000162, 2009. ISSN 1549-1676.

MBUBA, C. K. *et al.* The epilepsy treatment gap in developing countries: a systematic review of the magnitude, causes, and intervention strategies. **Epilepsia**, v. 49, n. 9, p. 1491-1503, 2008. ISSN 0013-9580.

NELIGAN, A.; HAUSER, W. A.; SANDER, J. W. The epidemiology of the epilepsies. In: (Ed.). **Handbook of clinical neurology**: Elsevier, v.107, 2012. p.113-133. ISBN 0072-9752.

NETO, J. G.; MARCHETTI, R. L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia Epidemiologic aspects and relevance of mental disorders associated with epilepsy. **Revista Brasileira Psiquiatria**, v. 27, n. 4, p. 323-8, 2005.

NEVES, R. S. *et al.* Granule cell dispersion is associated with memory impairment in right mesial temporal lobe epilepsy. **Seizure**, v. 21, n. 9, p. 685-90, 2012a. ISSN 1059-1311.

NEVES, R. S. D. C. *et al.* Granule cell dispersion is associated with memory impairment in right mesial temporal lobe epilepsy. **Seizure**, v. 21, n. 9, p. 685-690, 2012b. ISSN 1059-1311.

NEWTON, C. R.; GARCIA, H. H. Epilepsy in poor regions of the world. **The Lancet**, v. 380, n. 9848, p. 1193-1201, 2012. ISSN 0140-6736.

NGUGI, A. K. *et al.* Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. **Epilepsia**, v. 51, n. 5, p. 883-890, 2010. ISSN 0013-9580.

NOBILI, P. *et al.* Continuous neurodegeneration and death pathway activation in neurons and glia in an experimental model of severe chronic epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 83, p. 54-66, 2015. ISSN 0969-9961.

- NOVY, J. *et al.* The lifelong course of chronic epilepsy: the Chalfont experience. **Brain**, v. 136, n. Pt 10, p. 3187-99, 2013. ISSN 0006-8950.
- OLSEN, R. W.; AVOLI, M. GABA and epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 38, n. 4, p. 399-407, 1997. ISSN 0013-9580.
- OYEGBILE, T. O. *et al.* Quantitative MRI biomarkers of cognitive morbidity in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 1, p. 143-152, 2006. ISSN 0013-9580.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 581-618, 1998. ISSN 0301-0082.
- PASCUAL, O. *et al.* Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. **Science**, v. 310, n. 5745, p. 113-6, 2005. ISSN 0036-8075.
- PAULI, E. *et al.* Deficient memory acquisition in temporal lobe epilepsy is predicted by hippocampal granule cell loss. **Neurology**, v. 67, n. 8, p. 1383-1389, 2006. ISSN 0028-3878.
- PEDIATRICS, A. A. O. Neurodiagnostic evaluation of the child with a simple febrile seizure. **Pediatrics**, v. 127, n. 2, p. 389, 2011. ISSN 1098-4275.
- PEIXOTO-SANTOS, J. E. *et al.* Manual hippocampal subfield segmentation on high-field MRI: impact of different subfields in hippocampal volume loss of temporal lobe epilepsy patients. **Frontiers in neurology**, v. 9, p. 927, 2018. ISSN 1664-2295.
- PEIXOTO-SANTOS, J. E. *et al.* Increased metallothionein I/II expression in patients with temporal lobe epilepsy. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44709, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203.
- PEIXOTO-SANTOS, J. E.; KANDRATAVICIUS, L. Individual hippocampal subfield assessment indicates that matrix macromolecules and gliosis are key elements for the increased T2 relaxation time seen in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 58, n. 1, p. 149-159, 2017. ISSN 0013-9580.
- PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. **Trends of Neuroscience**, v. 32, n. 8, p. 421-31, 2009. ISSN 0166-2236.
- PEREIRA, F. R. *et al.* Asymmetrical hippocampal connectivity in mesial temporal lobe epilepsy: evidence from resting state fMRI. **BMC neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 66, 2010. ISSN 1471-2202.
- PIAO, Y. S. *et al.* Neuropathological findings in intractable epilepsy: 435 Chinese cases. **Brain Pathology**, v. 20, n. 5, p. 902-8, 2010. ISSN 1015-6305.
- PRADA JARDIM, A. *et al.* Characterising subtypes of hippocampal sclerosis and reorganization: correlation with pre and postoperative memory deficit. **Brain Pathology**, v. 28, n. 2, p. 143-154, 2018. ISSN 1015-6305.
- PUTTACHARY, S. *et al.* Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 745613, 2015. ISSN 2314-6141.
- RANSOHOFF, R. M. Specks of insight into Alzheimer's disease. **Nature Publishing Group**, 2017.

RAVIZZA, T. *et al.* Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 29, n. 1, p. 142-60, 2008. ISSN 0969-9961.

REIS, J.L. *et al.* Avaliação do desfecho pós-cirúrgico de pacientes com epilepsia do lobo temporal farmacorresistente do HC-UFG e caracterização farmacoterapêutica pré e pós-cirúrgica. **Revista Medica de Minas Gerais**, v. 2019, n. 29, 2017.

RENZEL, R.; BAUMANN, C. R.; PORYAZOVA, R. EEG after sleep deprivation is a sensitive tool in the first diagnosis of idiopathic generalized but not focal epilepsy. **Clinical Neurophysiology**, 2015. ISSN 1388-2457.

RILEY, J. D. *et al.* Altered white matter integrity in temporal lobe epilepsy: association with cognitive and clinical profiles. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 536-545, 2010. ISSN 1528-1167.

RITZEL, R. M. *et al.* Functional differences between microglia and monocytes after ischemic stroke. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 106, 2015. ISSN 1742-2094.

RONALDSON, P. T.; DAVIS, T. P. Blood-brain barrier integrity and glial support: mechanisms that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 25, p. 3624, 2012.

ROSETI, C. *et al.* GABAA currents are decreased by IL-1 $\beta$  in epileptogenic tissue of patients with temporal lobe epilepsy: implications for ictogenesis. **Neurobiology of Disease**, v. 82, p. 311-320, 2015. ISSN 0969-9961.

SADEK, A.-R.; GRAY, W. P. Chopping and changing: long-term results of epilepsy surgery. **The Lancet**, v. 378, n. 9800, p. 1360-1362, 2011. ISSN 0140-6736.

SCHILTZ, N. K.; VACA, G. F.-B. Epidemiologist's view: Addressing the epilepsy surgery treatment gap with minimally-invasive techniques. **Epilepsy research**, v. 142, p. 179-181, 2018. ISSN 0920-1211.

SCHRAMM, J. Temporal lobe epilepsy surgery and the quest for optimal extent of resection: a review. **Epilepsia**, v. 49, n. 8, p. 1296-1307, 2008. ISSN 0013-9580.

SENEVIRATNE, U.; COOK, M.; D'SOUZA, W. Focal abnormalities in idiopathic generalized epilepsy: a critical review of the literature. **Epilepsia**, v. 55, n. 8, p. 1157-69, Aug 2014. ISSN 1528-1167.

SHORVON, S. D.; GOODRIDGE, D. M. Longitudinal cohort studies of the prognosis of epilepsy: contribution of the National General Practice Study of Epilepsy and other studies. **Brain**, v. 136, n. 11, p. 3497-3510, 2013. ISSN 1460-2156.

SILVEIRA, G.; DE OLIVEIRA, A. C. P.; TEIXEIRA, A. L. Insights into inflammation and epilepsy from the basic and clinical sciences. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 1071-1075, 2012. ISSN 0967-5868.

STEFAN, H. *et al.* Clinical prediction of postoperative seizure control: structural, functional findings and disease histories. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 80, n. 2, p. 196-200, 2009. ISSN 0022-3050.

STEINHÄUSER, C.; SEIFERT, G.; BEDNER, P. Astrocyte dysfunction in temporal lobe epilepsy: K<sup>+</sup> channels and gap junction coupling. **Glia**, v. 60, n. 8, p. 1192-1202, 2012. ISSN 1098-1136.

STRAUSS, E.; SHERMAN, E. M.; SPREEN, O. **A compendium of neuropsychological tests: Administration, norms, and commentary**. American Chemical Society, 2006. ISBN 0195159578.

STRZELCZYK, A. *et al.* Cost of epilepsy. **Pharmacoeconomics**, v. 26, n. 6, p. 463-476, 2008. ISSN 1170-7690.

TAI, X. *et al.* Neurodegenerative processes in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: Clinical, pathological and neuroimaging evidence. **Neuropathology and applied neurobiology**, 2017. ISSN 1365-2990.

TASSI, L. *et al.* Temporal lobe epilepsy: neuropathological and clinical correlations in 243 surgically treated patients. **Epileptic Disorders**, v. 11, n. 4, p. 281-92, 2009. ISSN 1294-9361.

TEIXEIRA, A. L.; SALGADO, J. V. Epilepsia: uma revisão para o psiquiatra. **Psiquiatria biológica**, v. 12, n. 3, p. 107-114, 2004. ISSN 0104-7787.

THOM, M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 40, n. 5, p. 520-43, 2014. ISSN 1365-2990 .

THOM, M. *et al.* Quantitative post-mortem study of the hippocampus in chronic epilepsy: seizures do not inevitably cause neuronal loss. **Brain**, v. 128, n. Pt 6, p. 1344-57, 2005. ISSN 0006-8950.

TOSCANO, E. C. B. *et al.* Bcl-2/Bax ratio increase does not prevent apoptosis of glia and granular neurons in patients with temporal lobe epilepsy. **Neuropathology**, 2019. ISSN 0919-6544.

UYSAL, H. *et al.* Is the cell death in mesial temporal sclerosis apoptotic? **Epilepsia**, v. 44, n. 6, p. 778-84, 2003. ISSN 0013-9580.

VAN GASSEN, K. L. *et al.* Possible role of the innate immunity in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 49, n. 6, p. 1055-1065, 2008. ISSN 0013-9580.

VAN VLIET, E. *et al.* Blood–brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. **Brain**, v. 130, n. 2, p. 521-534, 2007. ISSN 0006-8950.

VEZZANI, A. *et al.* Epilepsy and brain inflammation. **Experimental Neurology**, v. 244, p. 11-21, 2013. ISSN 0014-4886.

VEZZANI, A. *et al.* The role of inflammation in epilepsy. **Natural Reviews Neurology**, v. 7, n. 1, p. 31-40, 2011. ISSN 1759-4766.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, v. 46, n. 11, p. 1724-43, 2005. ISSN 0013-9580.

VIEIRA, É. L. M. *et al.* Peripheral leukocyte profile in people with temporal lobe epilepsy reflects the associated proinflammatory state. **Brain, behavior, and immunity**, v. 53, p. 123-130, 2016. ISSN 0889-1591.

VILELA, L. R. *et al.* Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylenetetrazole model: Pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels. **Epilepsy & Behavior**, v. 75, p. 29-35, 2017. ISSN 1525-5050.

WALKER, L.; SILLS, G. J. Inflammation and Epilepsy: The Foundations for a New Therapeutic Approach in Epilepsy? *Inflammation and Epilepsy*. **Epilepsy currents**, v. 12, n. 1, p. 8-12, 2012. ISSN 1535-7597.

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

WANG, S. *et al.* The association of psychosocial variables with adherence to antiepileptic drugs in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 77, p. 39-43, 2017. ISSN 1525-5050.

WECHSLER, D. Wechsler memory scale. **Psychological Corporation**, 1945.

WECHSLER, D. Wechsler memory scale-revised. **Psychological Corporation**, 1987.

WEISSBERG, I. *et al.* Albumin induces excitatory synaptogenesis through astrocytic TGF-beta/ALK5 signaling in a model of acquired epilepsy following blood-brain barrier dysfunction. **Neurobiology of Disease**, v. 78, p. 115-25, 2015. ISSN 0969-9961.

WIRRELL, E. C. Predicting pharmacoresistance in pediatric epilepsy. **Epilepsia**, v. 54, p. 19-22, 2013. ISSN 0013-9580.

YACUBIAN, E. M.; KOCHEN, S. Crises epilépticas. **São Paulo: Ed. Casa Leitura Médica**, v. 6, 2014.

YANG, T.; ZHOU, D.; STEFAN, H. Why mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression? **Journal of Neurological Science**, v. 296, n. 1-2, p. 1-6, 2010. ISSN 0022-510x.

YE, H.; KASZUBA, S. Inhibitory or excitatory? Optogenetic interrogation of the functional roles of GABAergic interneurons in epileptogenesis. **Journal of biomedical science**, v. 24, n. 1, p. 93, 2017. ISSN 1423-0127.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 CLASSIFICAÇÃO DA ESCLEROSE HIPOCAMPAL E AVALIAÇÃO DA GLIOSE E DA VIA INTRÍNSECA DA APOPTOSE EM HIPOCAMPOS DE PACIENTES COM ELT**

A ELT está frequentemente associada à EH, que é caracterizada por gliose e perda neuronal, principalmente na região CA. Independentemente do tipo de EH, a gliose é sempre colocalizada com perda neuronal, sugerindo uma associação entre esses processos. De fato, a ativação da glia induz apoptose neuronal e glial, que promove e intensifica a EH. Mecanismos anti-apoptóticos também são ativados, a fim de conter os efeitos deletérios da apoptose na epilepsia crônica. No entanto, o papel da via intrínseca da apoptose na ELT humana não é claro, principalmente em relação à morte glial. O objetivo geral deste estudo foi avaliar a expressão de proteínas gliais e da caspase-3 ativa, paralelamente à relação Bcl-2/Bax em hipocampos de pacientes com ELT em comparação com hipocampos controles. Além disso, investigou-se uma possível associação entre esses marcadores e parâmetros clínicos na ELT.

#### **5.1.1 Objetivos específicos:**

- Classificar a EH, segundo a ILAE, presente na população estudada.
- Quantificar e comparar a expressão de proteínas de astrócitos e micróglia ativadas em hipocampos escleróticos e controles.
- Avaliar, quantitativamente, o balanço entre proteínas apoptótica e anti-apoptótica da via intrínseca em hipocampos escleróticos e controles.
- Avaliar a população de células que efetivamente estão em apoptose em hipocampos escleróticos, comparados a controles.

Os resultados dessa sessão, bem como a discussão dos mesmos, foram publicados no artigo “Bcl-2/Bax ratio increase does not prevent apoptosis of glia and granular neurons in patients with temporal lobe epilepsy”, na revista *Neuropathology* (Fator de Impacto 2,2; QUALIS B2) e estão disponíveis a seguir:

## Original Article

# Bcl-2/Bax ratio increase does not prevent apoptosis of glia and granular neurons in patients with temporal lobe epilepsy

Eliana C. de Brito Toscano,<sup>1,2\*</sup> Érica L.M. Vieira,<sup>2\*</sup> Ana C.D.C. Portela,<sup>1</sup> Joice L.J. Reis,<sup>1</sup> Marcelo V. Caliari,<sup>1</sup> Alexandre V. Giannetti,<sup>3</sup> Ana P. Gonçalves,<sup>3,4</sup> José M. Siqueira,<sup>4</sup> Claudia K. Suemoto,<sup>5</sup> Renata E.P. Leite,<sup>5</sup> Ricardo Nitrini,<sup>5</sup> Antônio L. Teixeira<sup>2,6</sup> and Milene A. Rachid<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, <sup>2</sup>Neuroscience Division, Interdisciplinary Laboratory of Medical Investigation, <sup>3</sup>Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, <sup>4</sup>Núcleo de Advanced Epilepsy Treatment – Felício Rocho Hospital, Belo Horizonte, <sup>5</sup>Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil and <sup>6</sup>Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, Texas, USA

Temporal lobe epilepsy (TLE) is usually associated with hippocampal sclerosis (HS), characterized by gliosis and neuronal loss, mainly in the cornus ammonis (CA). Regardless the type of HS, gliosis is associated with neuronal loss. Indeed, glial reactivation seems to induce both neuronal and glial apoptosis. Anti-apoptotic mechanisms are also activated in order to contain the cell death in chronic epilepsy. However, the role of the intrinsic apoptosis pathway in human TLE is unclear, mainly in relation to glial death. The purpose of this study was to evaluate the reactive gliosis areas in parallel with Bcl-2/Bax ratio and active caspase 3 immunoreactivity in hippocampi of TLE patients in comparison with control hippocampi. We also sought to investigate whether the levels of these markers were correlated with TLE clinical parameters. Paraffin-embedded sclerotic and control hippocampi were collected for immunohistochemical analyses of glial fibrillary acidic protein (GFAP), human leucocyte antigen DR (HLA-DR), neuronal nuclei protein (NeuN), Bax, Bcl-2 and active caspase 3. Sclerotic hippocampi presented higher immunoreactivity areas of GFAP and HLA-DR than controls, with similar values in HS types 1 and 2. Bcl-2 protein expression was increased in epileptic

hippocampi, while Bax expression was similar to controls. Despite Bcl2/Bax ratio increase, granular neurons and glia exhibited active caspase 3 expression in TLE hippocampi, while controls did not show staining for the same marker. In conclusion, glial and neuronal death is increased in sclerotic hippocampi, independently of HS type, and colocalized with gliosis. Furthermore, Bcl-2/Bax ratio increase does not prevent expression of active caspase 3 by glia and granular neurons in TLE.

**Key words:** gliosis, hippocampal sclerosis, intrinsic apoptosis, temporal lobe epilepsy.

## INTRODUCTION

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the main type of drug-resistant epilepsy in adult patients, who usually exhibit high seizure frequency until resection of epileptic focus (generally, hippocampus and amygdala).<sup>1–3</sup> Hippocampal sclerosis (HS), the most common lesion present in postoperative specimens of TLE, is classified into three types, according to the severity and localization of neuronal loss and gliosis in cornus ammonis (CA) subfields.<sup>3,4</sup> This classification is associated with clinical parameters and postoperative outcomes. Patients with HS type 1 present earlier seizure onset than patients with HS types 2 or 3, but HS type 1 is related with better postoperative outcome.<sup>1,5,6</sup> Recently, studies have shown association between neuronal loss and/or gliosis in the hippocampus with cognitive deficits,<sup>7,8</sup> electrophysiological and magnetic resonance imaging (MRI) findings<sup>9,10</sup> and psychiatric comorbidities in patients with TLE.<sup>11–13</sup>

Correspondence: Milene A. Rachid, PhD, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil. Email: milenerachid@gmail.com

\*Contributed equally to this study

Received 29 April 2019; revised 06 June 2019; accepted 08 July 2019.

© 2019 Japanese Society of Neuropathology

## **Bcl-2/Bax ratio increase does not prevent apoptosis of glia and granular neurons in patients with temporal lobe epilepsy**

Eliana Cristina de Brito Toscano<sup>a,b\*</sup>, Érica Leandro Marciano Vieira<sup>b\*</sup>, Ana Carolina Diniz Carvalho Portela<sup>a</sup>, Joice Luiza Jardim Reis<sup>a</sup>, Marcelo Vidigal Caliari<sup>a</sup>, Alexandre Varella Giannetti<sup>c</sup>, Ana Paula Gonçalves<sup>c,d</sup>, José Maurício Siqueira<sup>d</sup>, Claudia Kimie Suemoto<sup>e</sup>, Renata Elaine Paraizo Leite<sup>e</sup>, Ricardo Nitrini<sup>e</sup>, Antônio Lúcio Teixeira<sup>b,f\*</sup>, Milene Alvarenga Rachid<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup>Neuroscience Division, Interdisciplinary Laboratory of Medical Investigation, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>c</sup>Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>d</sup>Núclei of Advanced Epilepsy Treatment – Felício Rocho Hospital, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>e</sup>Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

<sup>f</sup>Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, University of Texas Health Science Center at Houston, TX, United States

\*Contributed equally to this study.

### **Abstract**

Temporal lobe epilepsy (TLE) is usually associated with hippocampal sclerosis (HS), characterized by gliosis and neuronal loss, mainly in the Cornu Ammonis (CA). Regardless the type of HS, gliosis is associated with neuronal loss. Indeed, glial reactivation seems to induce both neuronal and glial apoptosis. Anti-apoptotic mechanisms are also activated in order to contain the cell death in chronic epilepsy. However, the role of intrinsic apoptosis pathway in human TLE is unclear, mainly in relation to glial death. The purpose of this study was to evaluate the reactive gliosis areas in parallel with Bcl-2/Bax ratio and active caspase-3 immunostaining in hippocampi of TLE patients in comparison with control hippocampi. We also sought to investigate whether the levels of these markers were correlated with TLE clinical parameters. Paraffin-embedded sclerotic and control hippocampi were collected for immunohistochemical analyses of glial fibrillary acidic protein (GFAP), human leucocyte

antigen DR (HLA-DR), neuronal nuclei protein (NeuN), Bax, Bcl-2 and active caspase-3. Sclerotic hippocampi presented higher immunoreactivity area of GFAP and HLA-DR than control, with similar values in HS type 1 and 2. Bcl-2 protein expression was increased in epileptic hippocampi, while Bax expression was similar to control. Despite Bcl2/Bax ratio increase, granular neurons and glia exhibited active caspase-3 expression in TLE hippocampi, while controls did not show staining for the same marker. In conclusion, glial and neuronal death is increased in sclerotic hippocampi, independently of HS type, and co-localized with gliosis. Furthermore, Bcl-2/Bax ratio increase does not prevent expression of active caspase-3 by glia and granular neurons in TLE.

**Keywords:** temporal lobe epilepsy, hippocampal sclerosis, gliosis, intrinsic apoptosis.

## INTRODUCTION

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the main type of drug resistant epilepsy in adult patients, who usually exhibit high seizure frequency until resection of epileptic focus (generally, hippocampus and amygdala) <sup>1-3</sup>. Hippocampal sclerosis (HS), the most common lesion present in postoperative specimens of TLE, is classified into three types, according to the severity and localization of neuronal loss and gliosis in cornu ammonis (CA) subfields <sup>3,4</sup>. This classification is associated with clinical parameters and postoperative outcomes. Patients with HS type 1 present earlier seizure onset than patients with HS type 2 or 3, but HS type 1 is related with better postoperative outcome <sup>1,5,6</sup>. Recently, studies have shown association between neuronal loss and/or gliosis in hippocampus with cognitive deficits <sup>7,8</sup>, electrophysiological and magnetic resonance imaging (MRI) findings <sup>9,10</sup> and psychiatric comorbidities in patients with TLE <sup>11-13</sup>.

In TLE-associated HS, astrogliosis exhibits moderate to severe (fibrillary) distribution in CA subfields and is co-localized with neuronal loss in histopathological analyses <sup>5</sup>. HS is also associated with microglial activation and increased expression of cytokines as IL-1 $\beta$  in hippocampi from patients with TLE <sup>14</sup>. Importantly, a neuroinflammatory milieu contributes to hyperexcitability, decreasing gamma-aminobutyric acid currents, increasing cellular influx of calcium ions and neurotransmitters efflux, among other effects <sup>15-17</sup>. Reactive glial cells can also promote neuronal apoptosis directly, by upregulation of Bcl-2 and caspases, or indirectly, by overexpression of pro-inflammatory cytokines as TNF and IL-1 $\beta$  <sup>18,19</sup>.

Bcl-2 family proteins are critical regulators of apoptosis, either to inhibit or to promote cell death through the intrinsic pathway of apoptosis<sup>20,21</sup>. Bax is a crucial pro-apoptotic protein of the intrinsic pathway. Bax translocates to the mitochondria, inducing the release of cytochrome c to the cytoplasm. Finally, cytochrome c activates caspase-9 which cleaves caspase-3<sup>22,23</sup>. Bcl-2, an anti-apoptotic protein, can bind to Bax, inhibiting cytochrome c release<sup>24</sup>. Studies involving Bax expression in TLE are controversial. Some of them have demonstrated increase of Bax in sclerotic hippocampi, while others have shown similar immunostaining when compared to control samples. Bcl-2 and active caspases are overexpressed in both neuronal and glial cytoplasm of sclerotic hippocampi<sup>18,25-28</sup>.

In physiologic conditions, astrocytes are essential for synaptic glutamate uptake, preventing neuronal hypersynchronization and glutamatergic excitotoxicity<sup>16</sup>. However, reactive glia can promote neuronal apoptosis<sup>18</sup>. Actually, both proliferation and apoptosis of glia have been associated with epileptogenesis and HS<sup>29,30</sup>.

Apoptotic mechanisms involved in glial apoptosis are poorly studied, mainly in human TLE. There are not studies evaluating Bcl-2/Bax (anti/pro-apoptotic) ratio in HS and its relationship with glial loss. Further, it is not clear whether the intrinsic pathway really induces both glial and neuronal apoptosis. In this scenario, the aim of this study was twofold: i) to investigate the balance between anti- and pro-apoptotic mechanisms of the intrinsic pathway and apoptosis occurrence of the glial and neuronal (granular and pyramidal neurons) cells in HS; ii) to investigate whether glial apoptosis is associated with areas of reactive gliosis and neuronal loss in sclerotic hippocampi of TLE patients in comparison with control hippocampi.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURE**

### **Subjects**

We studied hippocampal specimens from 27 drug-resistant TLE patients, 12 men (44.4%) and 15 women (55.6%), submitted to standard en bloc resection of anterior temporal lobe or amygdalohippocampectomy. Patients presented median age of 39 (34-59) years old. All cases had confirmation of HS by brain MRI and routine neuropathological evaluation. Patient samples were provided by UFMG University Hospital and Nuclei of Advanced

Epilepsy Treatment (NATE) from Felício Rocho Hospital, both in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

For inclusion in the study, patients needed to be older than 18 years-old and to be diagnosed with TLE. TLE diagnosis was based on seizure semiology; ictal/interictal electroencephalogram to confirm seizure onset area in the temporal lobes; and MRI to confirm hippocampal atrophy and to exclude other significant lesions<sup>31</sup>. All patients were classified as drug resistant and forwarded to pre-surgical assessment according to the Epilepsy Clinic of UFMG University Hospital and NATE protocols. Epidemiological information and clinical variables, as seizure type, onset and frequency; illness length; drug regimen and post-surgical condition were obtained from medical records. This study was approved by the local ethic committee (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais), registration number 1.939.783, and the consent term was obtained from each patient.

For comparison, 20 control hippocampi from non-epileptic subjects, matched for gender and age, were supplied by the Biobank for Aging Studies, University of São Paulo, Brazil<sup>32</sup>. The control samples were obtained from necropsies (until 24 hours after the death) of 13 men (65%) and 7 women (35%) and analyzed in the same manner as the surgical specimens. Control individuals presented median age of 46 (25-57) years old. The causes of death were cardiomyopathy, hemopericardium, pulmonary edema and pulmonary thromboembolism. Control subjects had neither history of neurologic diseases nor histological abnormalities in the hippocampi.

### **Histopathology and immunohistochemistry**

Sections of 4 µm approximately were obtained from paraffin embedded tissue containing hippocampal fragments, and stained with hematoxylin and eosin. Other sections were used to perform immunohistochemistry for evaluation of reactive astrocytes and active microglia, mature neurons and apoptosis.

These sections were submitted to antigen recover with sodium-citrate buffer (pH= 6.0) and endogenous peroxidase blocking with 0.3% hydrogen peroxide solution (Spring Bioscience, Pleasanton, USA) for 15 min. After, the protein block was made with 0.5% bovine serum albumin and 0.5% casein solution (Spring Bioscience). The sections were incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal antibody against GFAP (MOB064, clone GA5, 1:200 dilution; Diagnostic BioSystem; Pleasanton, USA), mouse monoclonal

antibody against HLA-DR (ab20181, clone TAL1B5, 1:5000 dilution; Abcam, Cambridge, UK), rabbit polyclonal antibody against NeuN (ab104225, 1:3000 dilution; Abcam, Cambridge, UK), rabbit monoclonal antibody against active caspase-3 (9661, clone Asp 175, 1:500 dilution, Cell Signaling Technology, Danvers, USA), rabbit polyclonal antibody against Bax (sc-526, 1:100 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) and rabbit polyclonal antibody against Bcl-2 (sc-492, 1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA). For revelation, it was used secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase enzyme (Spring Bioscience) and diaminobenzidine chromogen (DAB) (Spring Bioscience). Finally, the sections were counterstained with hematoxylin.

In order to perform representative histopathological images of HE and immunohistochemistry markers, slides of control and sclerotic hippocampi were scanned using the 3D Histech software (Budapest, HU). The obtained images were analyzed using the Panoramic Viewer software (Budapest, HU).

### **Hippocampal sclerosis classification**

HS was characterized according to the International League Against Epilepsy (ILAE) Consensus Classification System<sup>4,5</sup>. Semiquantitative microscopic analysis of paraffin-embedded surgical specimen, hematoxylin and eosin staining, GFAP immunohistochemistry and NeuN immunohistochemistry was performed. Only samples including CA1 and CA4 subfields were analyzed. A scoring system based on neuronal loss (NeuN staining) for CA subfields (CA1-CA4) and standard of GFAP immunostaining was applied as standardized by ILAE<sup>5</sup>. The score was: 0 = no obvious neuronal loss or moderate astrogliosis; 1 = moderate neuronal loss and astrogliosis; 2 = severe neuronal loss and fibrillary astrogliosis. Dentate gyrus was also evaluated using a semiquantitative examination: 0 = normal granular cell layer, 1 = generalized or focal dispersion of granular cell layer, 2 = generalized or severe granular cell loss. When samples presented both dispersion and duplication, they were classified in the duplication subgroup<sup>9</sup>. Two blinded observers performed the HS classification using a multi-head microscope.

## Morphometric analysis

Quantification of GFAP (reactive astrocyte marker), HLA-DR (active microglia marker), Bax and Bcl-2 immunostaining area was performed using digital morphometry. To quantify this area, 20 frames for GFAP, Bax and Bcl-2 (magnificence of 200x) and 10 frames for HLA-DR (magnificence of 400x) of 53,333.4  $\mu\text{m}^2$  were digitalized using a JVCTK1270 microcamera and the KS300 software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Furthermore, the HLA-DR staining intensity was evaluated by the optical density (OD) calculation, according to described by Costa and co-workers<sup>33</sup>.

At least 100 positive cells for HLA-DR were analyzed randomly. OD was obtained using the ratio between the transmitted light of the analyzed area (I) and the incident light at 500 nm wavelength ( $I_0$ ), according to the Beer's law:  $\text{OD} = -\log I / I_0$ . In a digital specimen image, I is proportional to pixel grey value. Then, the sum of grey value divided by the area (in pixels) for each stained cell gives us the I value, which is inversely proportional to OD. The brightness values range to 0 from 125 was utilized in the image analyzer. After calibration, our  $I_0$  was equal to 181. OD values were expressed as grey units.

## Statistical analysis

All variables were tested for normality of distribution by means of the Shapiro-Wilk test. The Fisher's exact test was used for comparison of categorical variables. For comparison between two groups of numerical variables, we used the Mann-Whitney (nonparametric data) test or the t-test (parametric data). For correlational analyses, it was used the Pearson or Spearman correlation coefficient, for parametric and non-parametric variables, respectively. All analyses were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, San Diego, USA). The values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical significance was assumed for  $p < 0.05$  values.

## RESULTS

### **Demographical and/ clinical characteristics**

Clinical data of 27 TLE patients are shown in Table 1. All patients presented focal impaired awareness seizures and used at least two antiepileptic drugs (AEDs). They exhibited uncontrolled seizures and had a long-lasting condition. There was a predominance of HS type 1 and right temporal sclerosis. Patients and control had similar gender ( $p=0.09$ ) and age ( $p=0.31$ ).

**Table 1 - Clinical characteristics of TLE patients**

Clinical parameters	TLE patients (n=27)	
	n° or Mean (SD)	Proportion (%) or Median (range)
Type of seizures		
Focal aware	4	14.81%
Focal impaired awareness	27	100%
Focal to bilateral tonic clonic	16	59.26%
Epilepsy early age, in years	4.54 (3.19)	3.0 (0-13)
Duration of epilepsy in years	33.40 (10.90)	35.00 (18-55)
Frequency of seizures per month	6.15 (4.40)	4.00 (1.5-16)
MRI		
RHS	16	59.26%
LHS	11	40.74%
Hippocampal sclerosis		
Type 1	17	62.96%
Type 2	10	37.04%
AEDs		
2AEDs	18	66.67%
3AEDs	9	33.33%
Change of drug therapy (dose and/or number of AEDs until 2 years after the surgery)		
Yes	15	55.56%
No	9	33.33%
Not declared	3	11.11%
Seizure remission (until 2 years after the surgery)		
Yes	13	48.14%
No	11	40.74%
Not declared	3	11.11%

MRI - Magnetic Resonance Imaging; RHS - Right Hippocampal Sclerosis; LHS - Left Hippocampal Sclerosis; AEDs – Antiepileptic drugs; TLE - Temporal Lobe Epilepsy; n° - number. SD - Standard Deviation.

## **Histopathological changes and immunohistochemical characterization**

Hippocampi of control subjects (n=20) had no histological changes in the hematoxylin and eosin staining (Figure 1 – A1). All TLE hippocampi showed severe segmental loss of pyramidal neurons, mainly in CA1 subfield, with less prominent neuronal loss in CA3 and relative preservation of neuronal density in CA2 (Figure 1 – B1). Immunohistochemistry for NeuN, that exhibited nuclear and cytosolic staining pattern, confirmed these findings (Figure 1 – C1-D2). All TLE samples presented morphological changes in dentate gyrus characterized by focal dispersion, duplication or focal severe loss of granular cell layer (1 – B2). In some samples, both dispersion and duplication were observed, being classified in the duplication subgroup.

Diffuse areas of fibrillary astrogliosis were confirmed by abundant presence of astrocytes with immuno-stained cytoplasm for GFAP (Figure 1 – F1-F2), while control presented lower astrogliosis (Figure 1 – E1- E2). Membranous and cytoplasmic staining for HLA-DR evidenced predominance of branched microglia in control samples (Figure 1 – G2) and microglia with frequent amoeboid shape in hippocampi of patients. Furthermore, perivascular cuffs of microglia were observed in the neuropil from CA1 to CA4 subfields of sclerotic hippocampi (Figure 1 – H2).

All TLE tissues exhibit HS and most of them were classified as HS type 1 (63%), the remaining being classified as type 2. As expected, we observed that HS type 1 was associated with earlier seizure onset (Figure 2A) and lower seizure frequency in comparison with HS type 2 (Figure 2B).

Intrinsic apoptosis markers were detected in pyramidal neurons of CA layer and in granular neurons of dentate gyrus. In neurons, Bax had intense immunostaining in both TLE and control hippocampi (Figure 3 – A1-B2), while Bcl-2 immunostaining was mildly detected in controls (Figure 3 – E1-E2). Furthermore, in patients with TLE, neurons of CA subfield presented a granular pattern of Bax staining (Figure 3 – D1), while neurons of dentate gyrus exhibited a diffuse pattern as observed in control hippocampi (Figure 3 - C1-D2). In glial cells, Bax and Bcl-2 were also extensively expressed in sclerotic hippocampi (Figure 3 – B1-B2 and F1-F2, respectively).

Patients exhibited intense glial and mild to moderate granular neurons staining for active caspase-3 (Figure 3 – H1-H2). Glial cells immunopositive for active caspase-3 prevailed in the molecular layer of dentate gyrus and CA1 and CA4 subfields, co-localized with

neuronal loss and gliosis. Neither pyramidal neurons of TLE samples nor control hippocampi were positive for active caspase-3 (Figure 3 – G1-H2).

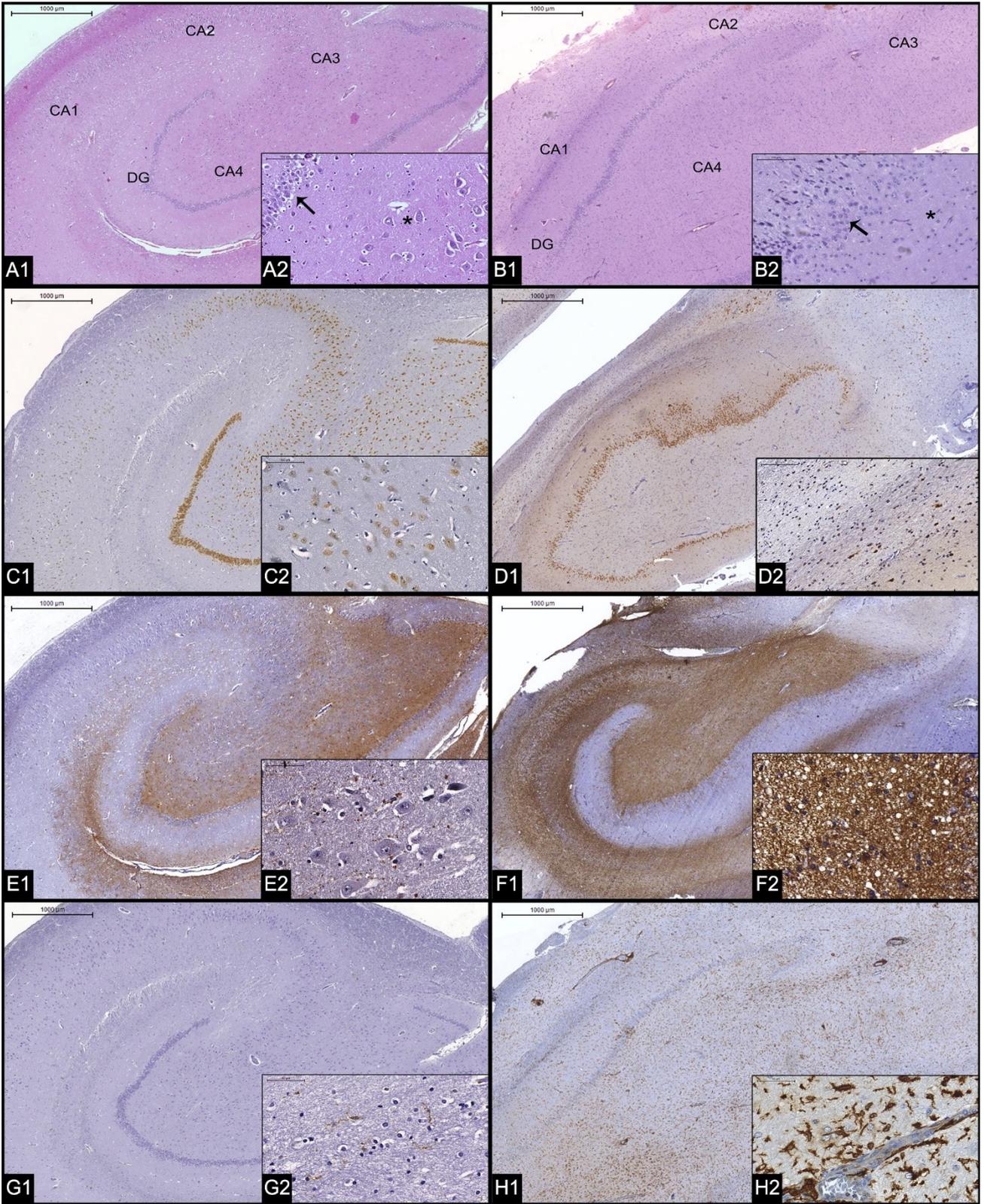


Figure 1 – Representative histopathological images of control hippocampi (column 1) and of sclerotic hippocampi (column 2). The control hippocampi did not exhibit changes neither at CA subfields neither at dentate gyrus (A1). In the insert (A2) is possible to observe the disposition of dentate gyrus in monolayer (arrow) and neurons at CA4 (\*). The sclerotic hippocampi presented diffuse pyramidal neuronal loss (B1). The insert (B2) indicates bilaminar dentate gyrus (arrow) and neuronal loss in CA4 (\*). Immunohistochemical reactions for NeuN (C1-D2), GFAP (E1-F2) and HLA-DR (G1-H2) confirmed the neuronal loss especially in CA1 and CA4 and fibrillary gliosis in TLE, while the controls presented neuronal preservation (C1) and lower expression of GFAP (E1) and HLA-DR (G1). Immunostaining in CA1 is highlighted for NeuN (CA2 and D2) and for GFAP (E2 and F2). A higher immunostaining area for HLA-DR was also demonstrated in sclerotic hippocampi (H1) in comparison with control (G1). Further, HLA-DR exhibited amoeboid shape, perivascular cuffs and higher intensity of immunostaining per cell (H2) than control samples (H1). A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1: 20x magnificence, scale bar of 1000 µm; A2, B2, C2, D2, E2, F2: 200x magnificence, scale bar of 100 µm; G2, H2: 400x magnificence, scale bar of 50 µm.

CA – cornus ammonis; NeuN – nuclear nuclei; GFAP – glial fibrillary acidic protein; HLA-DR: human leukocyte antigen DR; TLE – temporal lobe epilepsy.

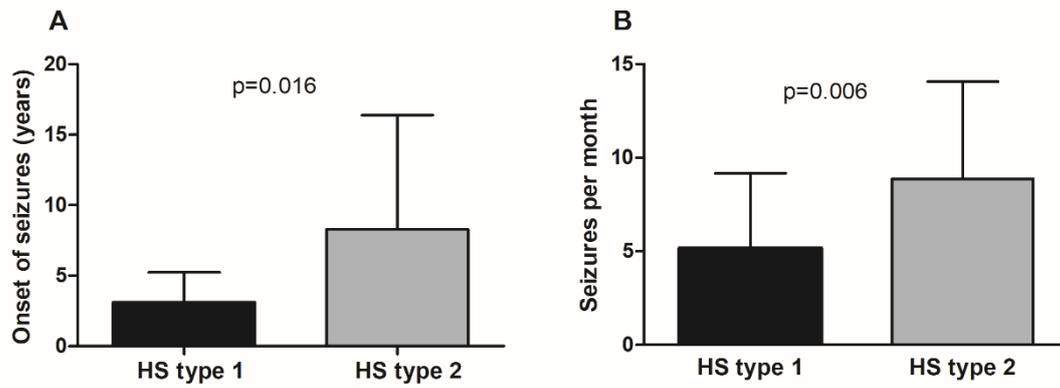


Figure 2 – Onset and frequency of seizures in TLE patients with HS1 and HS2. HS type 1 (n=17) presented early onset of seizures (A) and lower seizure frequency (B) in comparison with type 2 (n=10). Data are mean  $\pm$  SD and are considered significant when  $p < 0.05$ . TLE – temporal lobe epilepsy; HS – hippocampal sclerosis; SD – standard deviation.

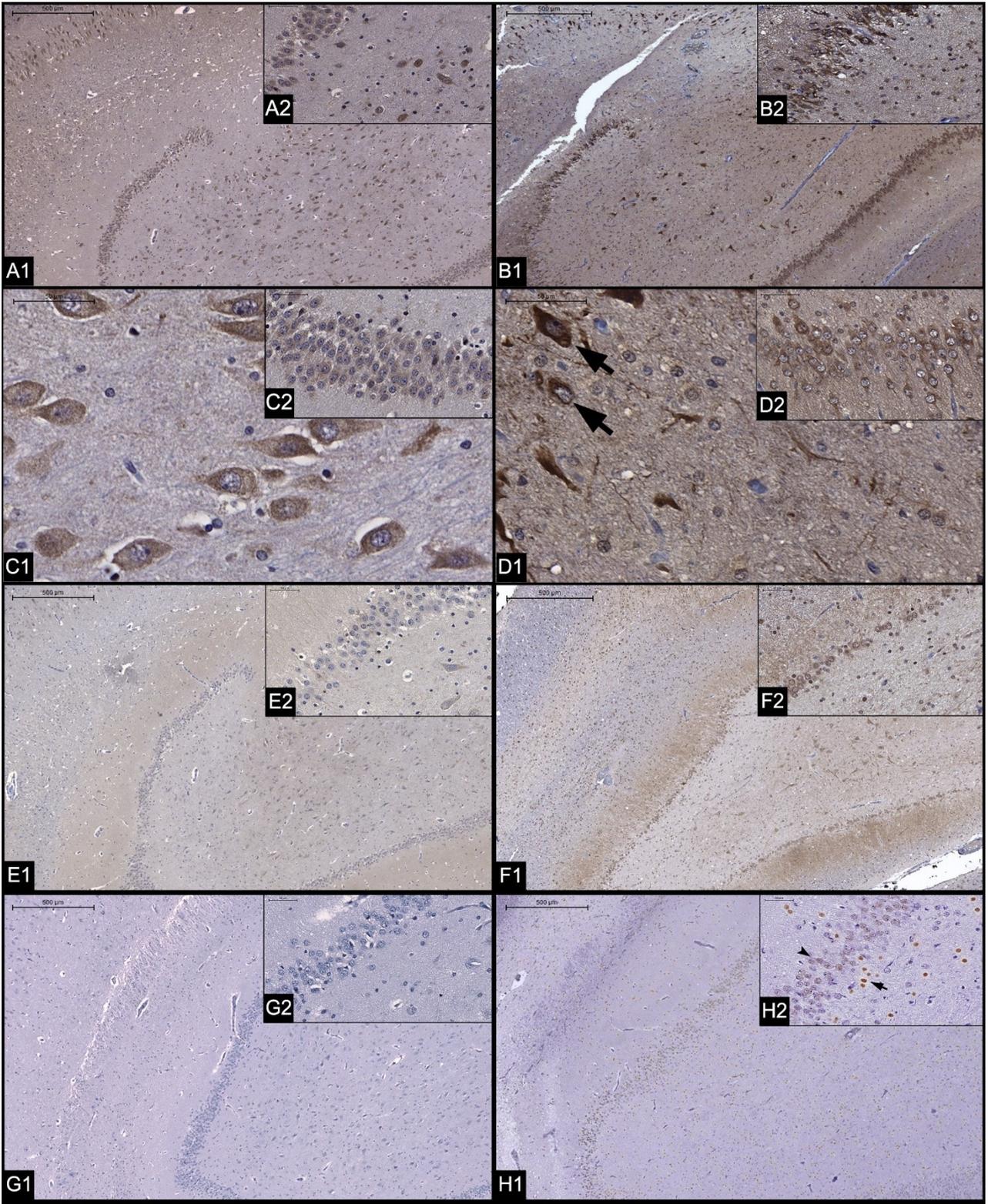


Figure 3 – Representative histopathological images of control hippocampi (column 1) and of sclerotic hippocampi (column 2). Granular neuron of dentate gyrus, pyramidal neurons of CA and glia were positive for immunohistochemical reaction against Bax in both control (A1 and A2) and sclerotic hippocampi (B1 and B2). Pyramidal neurons presented a granular pattern of Bax staining (arrow) (D1), while neurons of dentate gyrus exhibited a diffuse pattern (D2) as observed in control hippocampi (C1 e C2). Expression of Bcl-2 was higher in sclerotic hippocampi (F1 and F2) than control (E1 and E2) in neurons and glia. Interestingly, granular neurons exhibited a moderated immunostaining for active caspase-3 (arrow head in H2) and glial cells, an intense glial staining for the same marker (arrow in H2). Control hippocampi did not present positive cells for active caspase-3 (G1 and G2). A1, B1, E1, F1, G1, H1: 40x magnificence, scale bar of 500  $\mu\text{m}$ ; C1, D1: 400x magnificence, scale bar of 50  $\mu\text{m}$ ; A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2: 300x magnificence, scale bar of 50  $\mu\text{m}$ .  
CA – cornus ammonis.

## Morphometric analysis

Hippocampi from patients with TLE had higher GFAP ( $p < 0.001$ , t-test) and HLA-DR ( $p < 0.001$ , t-test) immunostaining area, while lower HLA-DR OD ( $p = 0.003$ , Mann Whitney test) than control hippocampi (Figure 4). These morphometric parameters were not different between HS type 1 and type 2 ( $p > 0.05$ ).

Regarding apoptotic markers, sclerotic hippocampi exhibited similar Bax staining area to controls ( $p = 0.191$ , t-test), but higher area for Bcl-2 ( $p < 0.001$ , Mann Whitney test) (Figure 5). Accordingly, Bcl-2/Bax ratio, an index of the balance between anti- and pro-apoptotic mechanisms, was higher in TLE ( $p = 0.009$ , Mann Whitney test) (Figure 5).

Epilepsy duration was positively correlated with GFAP ( $\rho = 0.403$ ,  $p = 0.045$ ) and negatively correlated with Bax ( $\rho = -0.718$ ,  $p = 0.006$ ).

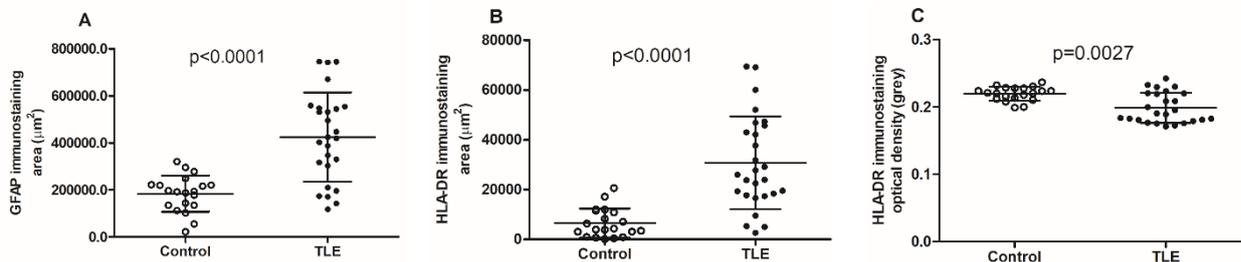


Figure 4 – Morphometric analysis of gliosis in HS. GFAP and HLA-DR immunostaining area were higher in TLE samples ( $n = 27$ ) than in control samples ( $n = 20$ ) (A and B, respectively). Complementary, optical density of HLA-DR was lower in TLE samples (C). OD values closer to zero correspond to stronger immunolabeling. Data are mean  $\pm$  SD and are considered significant when  $p < 0.05$ .

HS – hippocampal sclerosis; GFAP – glial fibrillary acid protein; HLA-DR – human leucocyte antigen DR; TLE – temporal lobe epilepsy; OD – optical density; SD – standard deviation.

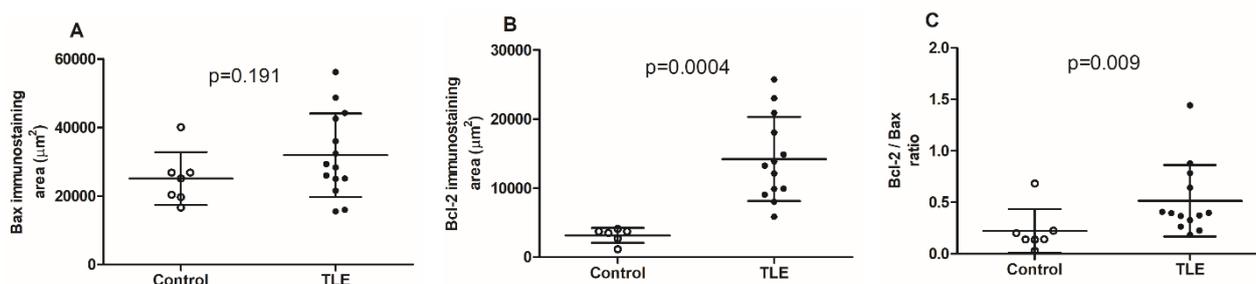


Figure 5 – Morphometric analysis of apoptotic proteins in HS. Bax area immunostaining was similar in control and TLE samples (A), while Bcl-2 area was higher in TLE (n=14) than in control (n=7) (B). In this scenario, Bcl-2/Bax ratio is enhanced in TLE samples, due to Bcl-2 increase (C). Data are mean  $\pm$  SD and are considered significant when  $p < 0.05$ .

HS – hippocampal sclerosis; TLE – temporal lobe epilepsy; SD – standard deviation.

## DISCUSSION

In the current study, we showed that the immunoreactive areas of the reactive astrocyte marker GFAP and the active microglia marker HLA-DR were increased in both type 1 and type 2 HS in comparison with control hippocampi, which is concordant with the literature<sup>4, 5, 12, 34</sup>. Besides the increase in the total immunostaining area, a higher HLA-DR staining intensity per cell was observed in sclerotic hippocampi. Regarding apoptosis, most granular neurons and glial cells from sclerotic hippocampi exhibited active caspase-3 expression, indicating ongoing apoptotic process, while control hippocampi did not show that. However, Bcl-2 was increased in sclerotic hippocampi. Interestingly, illness length was negatively correlated with Bax and positively correlated with GFAP.

Gliosis is a remarkable characteristic of HS. The distribution and profile of reactive astrocytes depend on HS type<sup>4, 5</sup>, and also on localization and severity of neuronal loss and inflammatory mediators in human TLE and experimental models<sup>14, 17, 19, 35</sup>. Activated microglia seems to play a major role in this regard, keeping the astrocytes in reactive status<sup>36</sup>. We noticed a similar expression of GFAP and HLA-DR in HS1 and HS2 subtypes. However, these proteins were more expressed at CA1 and CA4 subfields in HS1 and at CA4 in HS2, indicating that gliosis markers are co-localized with marked neuronal loss. Indeed, the inflammatory response, promoted mainly by the glia, has an important role in HS progression over the time. In this sense, the exacerbated inflammation induces a cyclical impairment of blood-brain barrier and frequent seizures leading a continuous self-propagating that results in progression of neuronal loss (according to the HS type)<sup>37</sup>.

It is possible that continuous central nervous system cells activation, especially glia,<sup>37,38</sup> can lead to apoptosis in TLE hippocampi<sup>29,39-42</sup> by overexpression of pro-inflammatory cytokines and chemokines, that induce DNA and mitochondrial damage, and by direct upregulation of apoptotic proteins of Bcl-2 family<sup>18,29</sup>.

Several studies have proposed the involvement of apoptosis in HS progression, however the role played by the intrinsic pathway in TLE is unclear. Experimental models have shown upregulation of Bcl-2 protein in sclerotic hippocampi in both neuronal and glial cells<sup>18,27,43,44</sup>. Furthermore, Bcl-xl was positively correlated with seizure frequency in amygdala-kindled seizure model, indicating an anti-apoptotic response after recurrent seizures as a possible attempt to prevent neuronal loss<sup>28</sup>. Glial apoptosis can reduce neuroinflammation at first, but later there may occur impairment of ionic homeostasis, reactive oxygen species buffering and glutamate reuptake, increasing the risk of glutamate-mediated excitotoxicity<sup>15,16,45,46</sup>.

Studies assessing Bax expression in sclerotic hippocampi show increase or similar levels of Bax compared to control<sup>18,25-28,47</sup>. Our study showed similar expression of Bax in both sclerotic and control hippocampi. Bax is constitutively expressed in the brain and, when translocates to the mitochondria, it activates apoptosis<sup>47,48</sup>. Together with the overexpression of Bcl-2 in TLE samples, our findings suggest an inhibition of the intrinsic apoptosis pathway, possibly as a cell attempt to survive under adverse chronic conditions<sup>18,25-27,44</sup>. Our result correlating decrease of Bax and increase of GFAP immunopositive area with longer illness length corroborates this assumption.

The assessment of the balance between pro-apoptotic and of anti-apoptotic mechanisms in parallel with active caspase-3 is important for a better understanding of the apoptosis pathways in human TLE. Despite the increase of Bcl-2 expression by glia and granular neurons in sclerotic hippocampi, there was immunostaining for active caspase-3 expression in these same cell types, indicating that this increase could not prevent apoptosis activation and, hence, cell death. In this scenario, it is tempting to speculate a cyclic process in which frequent seizures promote neuronal death and gliosis, and later glial apoptosis, leading to more seizures.

Interestingly, unlike glia and neurons of dentate gyrus, the neurons of CA subfields positive for Bax and Bcl-2 did not stain for active caspase-3. Most pyramidal neurons in sclerotic hippocampi presented granular pattern of staining for Bax, possibly indicating mitochondrial translocation and activation of apoptotic intrinsic pathway<sup>47</sup>. Conversely, neurons of dentate gyrus exhibited diffuse cytoplasmic staining, compatible with the

constitutive pattern of Bax. These observations suggest that the intrinsic pathway may be involved more directly in the apoptosis of neurons of CA subfields than in the apoptosis of neurons of dentate gyrus. Accordingly, the increase of Bcl-2 expression could inhibit apoptosis of pyramidal neurons, but not of granular neurons.

The current study has some limitations. Besides sample size, we did not evaluate mediators of pyroptosis and the apoptotic extrinsic pathway. Strengths include careful clinical phenotyping of patients and controls, quantitative morphometric analyses, and evaluation of anti- and pro-apoptotic molecules for cell type.

In conclusion, our data suggest that expression of GFAP and HLA-DR is independent of HS type 1 or 2, and is increased in hippocampi of TLE patients. Moreover, glial apoptosis is co-localized with neuronal loss and gliosis. This latter finding highlights the intricate balance between glia and neurons. Our results also suggest that the Bcl-2/Bax ratio increase does not prevent the loss of glial cells and granular neurons, unlike what occurs with pyramidal neurons in sclerotic hippocampi.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) for scholarship. We are also grateful to Centro de Aquisição de Imagens (CAPI) da UFMG.

### **Disclosure**

The authors declare no conflict of interests for this article.

### **REFERENCES**

- 1 Blümcke I, Pauli E, Clusmann H, *et al.* A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2007; **113**: 235-44.
- 2 Engel J, McDermott MP, Wiebe S, *et al.* Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial. *Jama.* 2012; **307**: 922-30.
- 3 Blümcke I, Coras R, Miyata H, Ozkara C. Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain pathology.* 2012; **22**: 402-11.
- 4 Thom M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathology and applied neurobiology.* 2014; **40**: 520-43.
- 5 Blümcke I, Thom M, Aronica E, *et al.* International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia.* 2013; **54**: 1315-29.
- 6 Bonilha L, Martz GU, Glazier SS, Edwards JC. Subtypes of medial temporal lobe epilepsy: influence on temporal lobectomy outcomes? *Epilepsia.* 2012; **53**: 1-6.

- 7 Coras R, Blümcke I. Clinico-pathological subtypes of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy and their differential impact on memory impairment. *Neuroscience*. 2015; **309**: 153-61.
- 8 Prada Jardim A, Liu J, Baber J, *et al*. Characterising subtypes of hippocampal sclerosis and reorganization: correlation with pre and postoperative memory deficit. *Brain pathology*. 2018; **28**: 143-54.
- 9 Calderon-Garciduenas AL, Mathon B, Levy P, *et al*. New clinicopathological associations and histoprognostic markers in ILAE types of hippocampal sclerosis. 2018.
- 10 Tezer FI, Xasiyev F, Soylemezoglu F, Bilginer B, Oguz KK, Saygi S. Clinical and electrophysiological findings in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis, based on the recent histopathological classifications. *Epilepsy research*. 2016; **127**: 50-54.
- 11 Kandratavicius L, Hallak JE, Young LT, Assirati JA, Carlotti CG, Jr., Leite JP. Differential aberrant sprouting in temporal lobe epilepsy with psychiatric co-morbidities. *Psychiatry research*. 2012; **195**: 144-50.
- 12 Kandratavicius L, Peixoto-Santos JE, Monteiro MR, *et al*. Mesial temporal lobe epilepsy with psychiatric comorbidities: a place for differential neuroinflammatory interplay. *Journal of neuroinflammation*. 2015; **12**: 38.
- 13 Wang S, Chen C, Jin B, *et al*. The association of psychosocial variables with adherence to antiepileptic drugs in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior*. 2017; **77**: 39-43.
- 14 Leal B, Chaves J, Carvalho C, *et al*. Brain expression of inflammatory mediators in Mesial Temporal Lobe Epilepsy patients. *Journal of neuroimmunology*. 2017; **313**: 82-88.
- 15 Eid T, Thomas M, Spencer D, *et al*. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *The Lancet*. 2004; **363**: 28-37.
- 16 Curia G, Lucchi C, Vinet J, *et al*. Pathophysiology of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? *Current medicinal chemistry*. 2014; **21**: 663.
- 17 Roseti C, van Vliet EA, Cifelli P, *et al*. GABAA currents are decreased by IL-1 $\beta$  in epileptogenic tissue of patients with temporal lobe epilepsy: implications for ictogenesis. *Neurobiology of disease*. 2015; **82**: 311-20.
- 18 Engel T, Henshall DC. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*. 2009; **1**: 97.
- 19 Vezzani A, Aronica E, Mazarati A, Pittman QJ. Epilepsy and brain inflammation. *Experimental neurology*. 2013; **244**: 11-21.
- 20 Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. 1999; **17**: 3225.
- 21 Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology letters*. 2004; **149**: 19-23.
- 22 Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Experimental cell research*. 2000; **256**: 50-7.
- 23 Jiang Z, Watts LT, Huang S, *et al*. The effects of methylene blue on autophagy and apoptosis in MRI-defined normal tissue, ischemic penumbra and ischemic core. *PloS one*. 2015; **10**: e0131929.
- 24 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science (New York, NY)*. 1998; **281**: 1322-6.
- 25 Uysal H, Cevik IU, Soylemezoglu F, *et al*. Is the cell death in mesial temporal sclerosis apoptotic? *Epilepsia*. 2003; **44**: 778-84.
- 26 Xu S, Pang Q, Liu Y, Shang W, Zhai G, Ge M. Neuronal apoptosis in the resected sclerotic hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2007; **14**: 835-40.
- 27 Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005; **25**: 1557-72.

- 28 Henshall DC, Clark RS, Adelson PD, Chen M, Watkins SC, Simon RP. Alterations in bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2000; **55**: 250-7.
- 29 Fiala M, Avagyan H, Merino JJ, *et al*. Chemotactic and mitogenic stimuli of neuronal apoptosis in patients with medically intractable temporal lobe epilepsy. *Pathophysiology*. 2013; **20**: 59-69.
- 30 Klein P, Dingledine R, Aronica E, *et al*. Commonalities in epileptogenic processes from different acute brain insults: Do they translate? *Epilepsia*. 2018; **59**: 37-66.
- 31 Engel J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2001; **42**: 796-803.
- 32 Grinberg LT, Heinsen H. Computer-assisted 3D reconstruction of the human basal forebrain complex. *Dementia & Neuropsychologia*. 2007; **1**: 140-46.
- 33 Costa CAX, Nunes AC, Ferreira AJ, Gomes MA, Caliri MV. Entamoeba histolytica and E. dispar trophozoites in the liver of hamsters: in vivo binding of antibodies and complement. *Parasites & Vectors*. 2010; **3**: 23-23.
- 34 Aalbers MW, Rijkers K, Majoie HJ, *et al*. The influence of neuropathology on brain inflammation in human and experimental temporal lobe epilepsy. *Journal of neuroimmunology*. 2014; **271**: 36-42.
- 35 Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nature reviews Neurology*. 2011; **7**: 31-40.
- 36 Ravizza T, Gagliardi B, Noe F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of disease*. 2008; **29**: 142-60.
- 37 Yang T, Zhou D, Stefan H. Why mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression? *Journal of the neurological sciences*. 2010; **296**: 1-6.
- 38 Leal B, Chaves J, Carvalho C, *et al*. Brain expression of inflammatory mediators in Mesial Temporal Lobe Epilepsy patients. *Journal of neuroimmunology*. 2017; **313**: 82-88.
- 39 Van Vliet E, da Costa Araujo S, Redeker S, Van Schaik R, Aronica E, Gorter J. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2007; **130**: 521-34.
- 40 Sinha S, Patil S, Jayalekshmy V, Satishchandra P. Do cytokines have any role in epilepsy? *Epilepsy research*. 2008; **82**: 171-76.
- 41 Ho Y-H, Lin Y-T, Wu C-WJ, Chao Y-M, Chang AY, Chan JY. Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. *Journal of biomedical science*. 2015; **22**: 46.
- 42 Vezzani A, Pascente R, Ravizza T. Biomarkers of epileptogenesis: The focus on glia and cognitive dysfunctions. *Neurochemical research*. 2017; **42**: 2089-98.
- 43 Le DA, Wu Y, Huang Z, *et al*. Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; **99**: 15188-93.
- 44 Murphy B, Dunleavy M, Shinoda S, *et al*. Bcl-w Protects Hippocampus during Experimental Status Epilepticus. *The American journal of pathology*. 2007; **171**: 1258-68.
- 45 Niquet J, Ben-Ari Y, Represa A. Glial reaction after seizure induced hippocampal lesion: immunohistochemical characterization of proliferating glial cells. *Journal of neurocytology*. 1994; **23**: 641-56.
- 46 Nobili P, Colciaghi F, Finardi A, Zambon S, Locatelli D, Battaglia GS. Continuous neurodegeneration and death pathway activation in neurons and glia in an experimental model of severe chronic epilepsy. *Neurobiology of disease*. 2015; **83**: 54-66.
- 47 Dericioglu N, Soylemezoglu F, Gursoy-Ozdemir Y, Akalan N, Saygi S, Dalkara T. Cell death and survival mechanisms are concomitantly active in the hippocampus of patients with mesial temporal sclerosis. *Neuroscience*. 2013; **237**: 56-65.

48 Hartmann A, Michel PP, Troadec JD, *et al.* Is Bax a mitochondrial mediator in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *Journal of neurochemistry*. 2001; **76**: 1785-93.

## **5.2 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE GLIOSE E DÉFICITS COGNITIVO EM PACIENTES COM ELT ASSOCIADA À ESCLEROSE HIPOCAMPAL**

A perda neuronal e a gliose no hipocampo, amígdala e córtex entorrinal são parâmetros críticos para confirmação e classificação da EH, especialmente na região CA. Há evidências envolvendo parâmetros clínicos, de neuroimagem e histopatológicos associando declínio cognitivo e presença de EH. De fato, o hipocampo é essencial para a formação e consolidação da memória episódica e lesões crônicas nessa região, como ocorre na ELT farmacorresistente, podem comprometer as funções de memória verbal e visual. Assim, a EH pode promover déficits cognitivos limitantes à qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, vários estudos têm relacionado a redução da densidade neuronal com o declínio da memória episódica na ELT. No entanto, não há estudos avaliando possíveis associações entre gliose e memória nesses pacientes. Assim, o objetivo central do estudo a seguir foi investigar a associação entre a expressão de proteínas gliais em hipocampus escleróticos e o desempenho dos pacientes com ELT em testes de aquisição e consolidação de memória verbal e visual.

### **5.2.1 Objetivos específicos**

- Investigar se há associação entre astrogliose/microgliose e escores acima e abaixo da média nos testes de Memória Lógica e Reprodução Visual I e II na ELT associada à EH.
- Identificar possíveis correlações entre gliose e performance dos pacientes nos referidos testes de memória episódica.
- Identificar possível associação/correlação entre parâmetros clínicos como tipo de EH, tempo de doença e frequência de crises com déficits cognitivos em pacientes com ELT associada à EH.

Os resultados dessa sessão, bem como a discussão dos mesmos, foram apresentados no artigo intitulado “Microgliosis is associated with memory decline in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis: a clinicopathologic study”, que foi aceito pela revista *Epilepsy & Behavior* (Fator de Impacto 2,7 e QUALIS B1) e estão disponíveis a seguir:

## **Microgliosis is associated with visual memory decline in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis: a clinicopathologic study**

**Eliana Cristina de Brito Toscano<sup>a,b</sup>, Érica Leandro Marciano Vieira<sup>b</sup>, Ana Carolina Diniz Carvalho Portela<sup>a</sup>, Marcelo Vidigal Caliari<sup>a</sup>, Joseane Aparecida Sousa Brant<sup>c</sup>, Alexandre Varella Giannetti<sup>c</sup>, Claudia Kimie Suemoto<sup>d</sup>, Renata Elaine Paraizo Leite<sup>d</sup>, Ricardo Nitrini<sup>d</sup>, Milene Alvarenga Rachid<sup>a#</sup>, Antônio Lúcio Teixeira<sup>e</sup>**

<sup>a</sup>Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup>Neuroscience Division, Interdisciplinary Laboratory of Medical Investigation, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>c</sup>Neurosurgery Division, Clinic Hospital, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>d</sup>Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

<sup>e</sup> Neuropsychiatry Program and Immuno-Psychiatry Lab, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, University of Texas Health Science Center at Houston, TX, United States

<sup>#</sup> Correspondent author.

Professor Milene Alvarenga Rachid

Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Patologia Celular e Molecular, Campus Pampulha, Av. Antônio Carlos 6.627 - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 31270-901

Phone/Fax: 55-31-34092878

e-mail: milenerachid@gmail.com (M.A. Rachid).

### **Abstract**

Hippocampal sclerosis (HS) is characterized by neuronal loss and gliosis. The intensity and distribution of these histopathological findings over the Cornus Ammonis (CA) subfields are important for the classification of HS and prognostication of patients with temporal lobe epilepsy (TLE). Several studies have associated the neuronal density reduction in the hippocampus with cognitive decline in patients with TLE. The current study aimed at investigating whether the expression of glial proteins in sclerotic hippocampi is associated with pre-surgical memory performance of patients with TLE. Before amygdalohippocampectomy, patients were submitted to memory tests. Immunohistochemical and morphometric analyses with glial fibrillary acidic protein

(GFAP) for astrogliosis and human leucocyte antigen DR (HLA-DR) for microgliosis were performed in paraffin-embedded HS and control hippocampi. Sclerotic hippocampi exhibited increased gliosis in comparison with controls. In patients with TLE, the area and intensity of staining for HLA-DR were associated with worse performance in the memory tests. GFAP was neither associated nor correlated with memory tests performance. Our data suggest association between microgliosis, but not astrogliosis, with visual memory decline in patients with TLE.

Keywords: gliosis, hippocampal sclerosis, temporal lobe epilepsy, memory

## **INTRODUCTION**

Hippocampal sclerosis (HS) is the most common histopathological finding in patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy (TLE). Neuronal loss and gliosis within the hippocampus, amygdala and entorhinal cortex are critical parameters for confirmation and classification of HS, especially in the Cornus Ammonis (CA) subfields [1].

Hippocampus is essential for episodic memory formation and consolidation [2, 3]. In TLE, subjects with intense loss of neurons in left hippocampus performed worse in verbal and nonverbal memory tests in comparison with subjects with moderate neuronal death [4]. Loss of neurons in CA1, CA4 and dentate gyrus (DG) subfields has also been associated with impaired preoperative verbal and visual memory in patients with TLE [5, 6, 7]. However, these results are not universal, with some studies reporting that neuronal loss in CA1 subfield is not associated with decreased performance in episodic memory tests in TLE [5, 8].

Besides neuronal loss, gliosis is a remarkable characteristic of HS in TLE. An exacerbated astroglial and microglial reactivation leads to a cyclical neuroinflammatory process fueled by released cytokines and chemokines, blood-brain barrier (BBB) permeability and, consequently, neuronal hyperexcitability and excitotoxicity [9, 10, 11]. Accordingly, morphological and functional alterations of astrocytes and microglia can impair the interactions between glia and neurons, influencing neurotransmitter balance, and neuronal plasticity [12]. These glial changes have been associated with memory impairment in neurodegenerative diseases [12, 13, 14, 15]. Despite the intense gliosis in the hippocampi of patients with TLE-HS, so far, no study evaluated the relation between gliosis and memory performance in these patients.

The aim of this study was to investigate the possible association between the expression of glial proteins (GFAP and HLA-DR) in sclerotic hippocampi of patients with TLE-HS and cognitive performance in tests of logical and visual memory. The understanding of the connection glial response-memory may be an important key to clarify the mechanisms involved in cognitive decline due to TLE.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Subjects**

This study included 20 patients with drug-resistant TLE, eight men and 12 women, who were followed at the Epilepsy Outpatients Clinic, UFMG University Hospital in Belo Horizonte, Brazil. These patients were submitted to selective amygdalohippocampectomy (n=20).

Patients needed to be older than 18 years-old and diagnosed with TLE. The diagnosis was based on seizure semiology; temporal seizure onset (confirmed by ictal/interictal electroencephalogram) and magnetic resonance imaging (MRI) [16]. Patients who had others neurologic dysfunctions and unstable somatic disorders were excluded [17]. Hippocampal sclerosis was confirmed in all cases by MRI and neuropathological evaluation of the surgical sections. Histopathological classification of HS followed the International League Against Epilepsy (ILAE) Consensus Classification System [1] and was performed according to Toscano and co-workers [18]. Sociodemographic and clinical variables were obtained from medical records.

For comparison, 20 control hippocampi of non-epileptic subjects, 13 men and seven women, matched for gender and age, were supplied by the Biobank for Aging Studies, University of São Paulo, Brazil [19]. Control subjects were free of neurologic diseases. The local ethics committee approved this study (protocol number 1.939.783).

### **Immunohistochemistry and morphometric analysis**

For evaluation of reactive astrocytes and microglia, immunohistochemistry was performed using sections of 4 µm approximately, obtained from paraffin embedded tissue containing hippocampal specimens. These specimens were submitted to antigen retrieval with citrate buffer and solutions to block endogenous peroxidase and proteins (Spring

Bioscience, Pleasanton, USA). They were incubated overnight at 4°C with monoclonal antibodies against GFAP (reactive astrocyte marker) (Diagnostic BioSystem; Pleasanton, USA) and HLA-DR (active microglia marker) (Abcam, Cambridge, UK). Secondary antibody conjugated to HRP (Spring Bioscience) and diaminobenzidine chromogen (DAB) (Spring Bioscience) were employed for amplification and revelation of reaction, respectively. Subsequently, the sections were counterstained with hematoxylin.

Measurement of GFAP and HLA-DR immunostaining area was performed using KS300 software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Twenty frames for GFAP and 10 frames for HLA-DR (both captured with an ×20 objective) were visualized by Axiolab Microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and digitalized using a Samsung SDC 415 (Seoul, SKO) microcamera, totaling areas of 869,172 $\mu\text{m}^2$  and 434,568 $\mu\text{m}^2$ , respectively. Brown pixels, indicating a positive staining, were selected for making a binary image, digital processing and measurement area ( $\mu\text{m}^2$ ).

HLA-DR staining intensity was also evaluated by the optical density (OD) calculation, according to described previously [20]. OD values were inversely proportional to immunostaining intensity and expressed as grey units.

### **Evaluation of logical and visual memory**

To evaluate verbal and visual memory performance before hippocampal resection, patients were submitted to Logical Memory I (immediate memory) and II (recall after 30 minutes) and Visual Reproduction I (immediate memory) and II (recall after 30 minutes) tests which are part of the Wechsler Memory Scale [21, 22]. Briefly, in the Logical Memory test, the patients listen to two short stories and have to reproduce them immediately and after 30 minutes. In the Visual Reproduction test, the examiner shows pictures of simple geometric forms to the patients who have to reproduce them immediately and after 30 minutes [21, 22]. The absolute values of memory tests scores are corrected by age and expressed as z-score. According to normative data, the z-score (corrected by age) equal or inferior to -0.7 (percentile 25) defined a performance below the average of the healthy population [21, 22, 23].

## Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was used to test the distribution of the variables. Mann-Whitney or t test was used for comparing, respectively, nonparametric or parametric data. For correlations, Pearson or Spearman coefficient were applied, for parametric and nonparametric variables, respectively. All analyses were performed using GraphPad Prism 5 software (La Jolla, San Diego, USA). The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical significance was set at  $p < 0.05$  values.

## RESULTS

Sociodemographic and clinical characterization of the 20 patients with TLE is shown in Table 1. Most of them exhibited HS type 1 and right HS (60%) was a bit more frequent than left (40%).

Pyramidal neurons of CA region suffered diffuse death in sclerotic hippocampi, confirmed by immunostaining for NEUN. Neuronal loss was prominent in CA1 and CA4 subfields, while CA2 and CA3 exhibited relative preservation of neuronal density, according to described by Toscano *et al.* (2019) [18].

We found higher GFAP (mean  $458104 \mu\text{m}^2 \pm 193732$  SD;  $p < 0.001$ , t-test) and HLA-DR ( $34585 \mu\text{m}^2 \pm 18282$  SD;  $p < 0.001$ , t-test) immunostaining area, while lower HLA-DR OD ( $0.1917 \text{ grey} \pm 0,02026$  SD;  $p = 0.001$ , Mann Whitney test) in the sclerotic hippocampi compared with control hippocampi (GFAP area: mean  $183968 \mu\text{m}^2 \pm 76292$  SD,  $n = 20$ ; HLA-DR area:  $6506 \mu\text{m}^2 \pm 5832$  SD,  $n = 20$ ; HLA-DR OD:  $0.2195 \text{ grey} \pm 0.01018$  SD,  $n = 20$ ). As a remark, OD is inversely proportional to HLA-DR intensity immunostaining, suggesting that sclerotic hippocampi had higher intensity of HLA-DR compared to controls. All sclerotic hippocampi exhibited diffuse and fibrillary areas of astrogliosis, confirmed by positive immunostaining for GFAP in the cytoplasm of astrocytes (Figure 1 – B and D). Microgliosis was confirmed by expression of HLA-DR on membrane and cytoplasm of microglial cells (Figure 1 – F and H). Control hippocampi exhibited moderate immunostaining for GFAP (Figure 1- A and C) and mild immunostaining for HLA-DR (Figure 1 – E and G). Gliosis was present in both CA1 and CA4 hippocampal areas.

Regarding memory performance, 15% (3) of the patients exhibited z-scores below the average (inferior to -0.7) [23] in the test of Logical Memory I, 20% (4) in Logical Memory

II test, 65% (13) in Visual Reproduction I test and 75% (15) in Visual Reproduction II test. Patients below the average performance in both Visual Reproduction I and II (n = 13 and n= 15, respectively) exhibited increased HLA-DR immunostaining area (p=0.0378 and p=0.0087, t-test) and HLA-DR OD (p=0.0089 and p=0.0184, Mann Whitney test) compared with patients above the average in the same tests (Figure 2). GFAP staining was similar among these two groups (Figure 2). Moreover, laterality and type of HS did not influence the performance of patients in Logical Memory and Visual Reproduction tests.

Increase of HLA-DR immunostaining area in sclerotic hippocampi exhibited negative correlation with performance in Visual Reproduction I and II and in Logical Memory I and II tests. OD for HLA-DR, that is inversely proportional to immunostaining intensity, presented positive correlation with performance in Visual Reproduction I and II tests, but not with Logical Memory I and II (Table 2). GFAP immunostaining in sclerotic hippocampi and clinical variables - illness length and seizure frequency - were not correlated neither with visual nor logical memory scores in patients with TLE (p>0.05).

Table 1 – Demographic and clinical characteristics of patients with TLE

Patients with TLE (n = 20)		
	N° / Mean (SD)	Proportion (%) / Median (range)
Sex		
Male	8	40%
Female	12	60%
Age in years	<b>42.05 (10.35)</b>	39.5 (24-58)
Educational level in years	6.8 (2.84)	<b>5.5 (4-11)</b>
Type of seizures		
Focal impaired awareness	20	100%
Focal aware	4	20%
Focal to bilateral tonic clonic	14	70%
Epilepsy early age, in years	<b>4.23 (2.89)</b>	3.0 (0-10)
Duration of epilepsy in years	<b>33.83 (11.37)</b>	35.5 (13.5-55)
Frequency of seizures per month	5.6 (4.55)	<b>3.5 (1.5-16)</b>
Laterality		
RHS	12	60%
LHS	8	40%
Hippocampal sclerosis		
Type 1	12	60%
Type 2	8	40%
AEDs		
2AEDs	15	75%
3or 4AEDs	5	25%

TLE - Temporal Lobe Epilepsy; N°- number; SD - Standard Deviation; RHS - Right Hippocampal Sclerosis; LHS - Left Hippocampal Sclerosis; AEDs – Antiepileptic drugs.

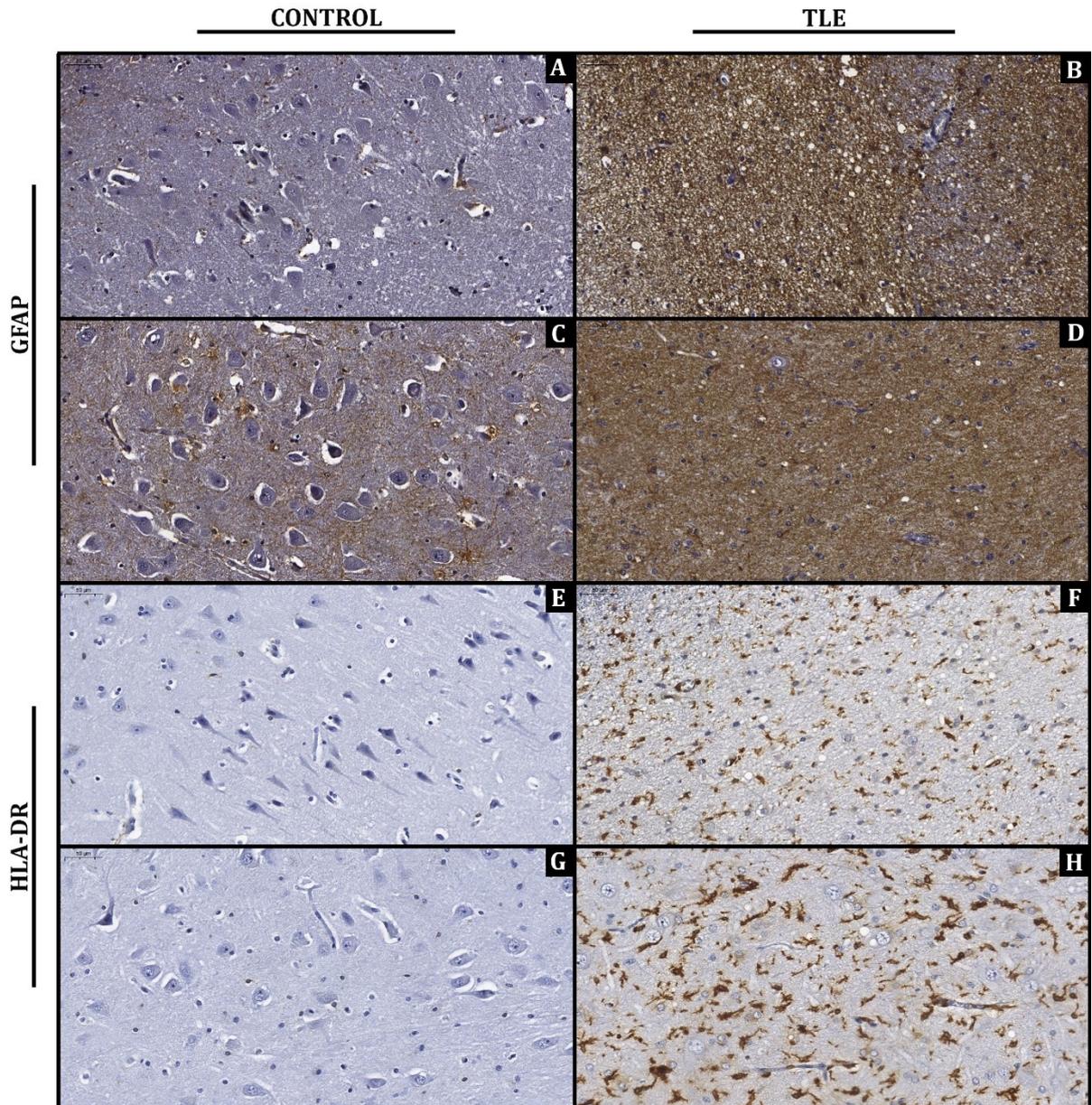


Figure 1 – Representative photomicrograph of gliosis in sclerotic hippocampi (column 2) compared with control hippocampi (column 1). Immunohistochemical reactions for GFAP (B and D) and HLA-DR (F and H) evidence the higher astrogliosis and microgliosis, respectively, in both CA1 (B and F) and CA4 (D and H) hippocampal areas of patients with TLE, while the control hippocampi presented lower expression of GFAP (A and C) and HLA-DR (E and G) also in CA1 (A and E) and CA4 (C and G) areas. A-H: 20x magnification, scale bar of 50  $\mu$ m. GFAP – glial fibrillary acidic protein; HLA-DR: human leukocyte antigen DR; CA – cornus ammonis; TLE – temporal lobe epilepsy.

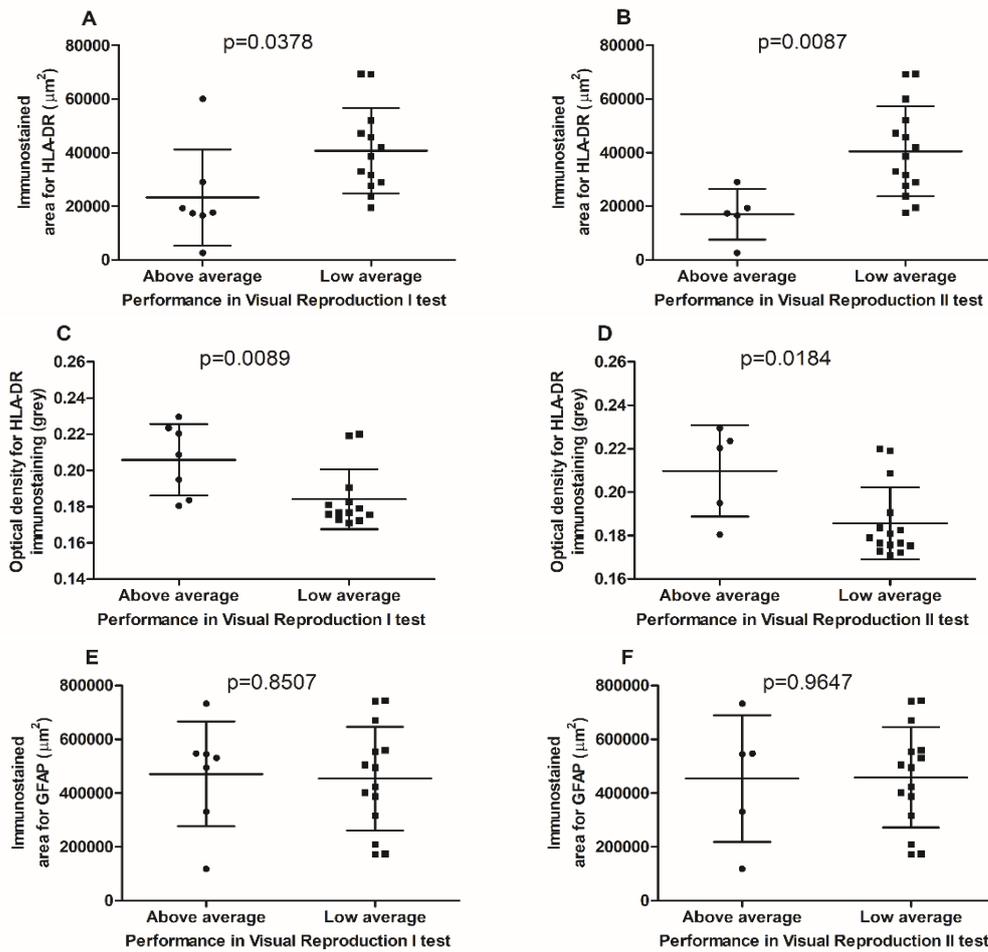


Figure 2 – Immunostaining of glial proteins in sclerotic hippocampi of TLE patients below and above of average in Visual Reproduction I (immediate memory) and II (recall /after 30 minutes) test. Immunostained HLA-DR area is increased in patients with worse performance in the teste of Visual Reproduction I and II (A and B, respectively). In line with this, hippocampi of patients below of the average presented higher intensity of staining for HLA-DR (lower OD) than hippocampi of patients above of average (C and D). Similar immunostaining area for GFAP was observed in patients below and above the average in visual reproduction I and II (E and F). t-test was utilized in A, B, E and F, while Mann Whitney test was performed for C and D analysis. Data are mean  $\pm$  SD and are considered significant when  $p < 0.05$ . TLE- temporal lobe epilepsy; HLA-DR – human leucocyte antigen DR; OD – optical density; GFAP – glial fibrillary acid protein; SD – standard deviation of mean.

Table 2 – Correlation between HLA-DR hippocampal immunostaining (area and OD) and performance of patients with TLE in Logical Memory and Visual Reproduction (both immediate and after 30 minutes) tests.

Patients with TLE (n = 20)			
Marker	Memory Test	p value	r value
HLA-DR (area)	Logical Memory I	<b>0.0269*</b>	-0.4940
	Logical Memory I	<b>0.0135*</b>	-0.5423
	Visual Reproduction I	<b>0.0408*</b>	-0.4609
	Visual Reproduction II	<b>0.0371*</b>	-0.4687
HLA-DR (OD)	Logical Memory I	0.0892**	0.3899
	Logical Memory II	0.1725**	0.3175
	Visual Reproduction I	<b>0.0082*</b>	0.5738
	Visual Reproduction II	<b>0.0079**</b>	0.5754

TLE – temporal lobe epilepsy; HLA-DR – human leucocyte antigen DR; OD – optical density. Values in bold represents statistical significance ( $p < 0.05$ ).

\*Pearson test was applied; \*\*Spearman test was applied.

## DISCUSSION

The current study showed association between microgliosis and visual memory performance in patients with TLE-HS. Despite astrogliosis in sclerotic hippocampi, GFAP immunostaining was not associated with memory performance in TLE-HS.

Neuronal loss has been implicated in cognitive decline, notably memory, in patients with TLE-HS [24]. Indeed, the hippocampus regulates episodic and spatial memory functions [25]. The extensive neuronal death in the hippocampal subfields has been associated with a worse performance in pre-surgical tests of visual and verbal memory, except in CA2 subfield [7, 26]. Some studies have suggested that injury in CA1 region is not as important as CA4 to episodic memory impairment, with a more significant memory impairment in patients with HS type 1 in comparison to patients with HS type 2 [27]. In the current study, possibly because of the small number of subjects in each type, we did not find influence of HS type in performance of the patients neither in Logical Memory (I and II) nor in Visual Reproduction (I and II) tests.

Beside neuronal loss, gliosis is an essential variable for diagnosis and classification of HS. Several studies have demonstrated the relation and co-localization of exacerbated reactivation of glial cells and neuronal loss in CA hippocampal subfields in patients with TLE [1, 18, 28]. Since gliosis can exacerbate neuroinflammation, leading to hippocampal neuronal loss [29, 30, 31], a better understanding of its regulation is essential to minimize the cognitive decline in TLE. Moreover, astrocytes and microglia play an important role in memory formation and consolidation under physiological conditions [32]. Chronic dysfunction of these cells in TLE could influence the homeostasis of hippocampal neuronal circuits, affecting memory performance, in addition to contributing to neuronal loss.

Recent experimental studies in neurodegenerative diseases have shown that glial cells are very important for the progression of protein aggregates, inducing increase of clumps and cognitive decline [33, 34, 35]. Post-mortem brain samples of patients with Alzheimer's and Parkinson's disease exhibit higher reactive gliosis than control samples [13, 36, 37]. Furthermore, imaging studies using positron emission tomography have shown correlation between radiolabel tracers for the 18 kDa translocator protein (TSPO), expressed in active microglia, and cognitive decline in patients with Alzheimer's disease, a condition defined by marked memory impairment [38]. In line with the evidence from neurodegenerative diseases, the association between microgliosis and Visual Reproduction suggests a role of the microglia in the cognitive decline observed in patients with TLE-HS. The correlation between higher hippocampal HLA-DR area and worse performance in logical and visual memory tests corroborates this assumption. In addition, HLA-DR OD was also correlated with Visual Reproduction II test. Therefore, besides the number of active microglia, the intensity of activation seems to be relevant. Regarding astrogliosis, we did not observe neither association nor correlation of the GFAP increase with the memory tests. These results corroborate, at least in part, the findings from neurodegenerative diseases in which microgliosis seems to be more critical to illness progression and cognitive decline than astrogliosis [33, 34, 39].

This study has some limitations. We just performed a semiquantitative analysis of neuronal loss in each hippocampal subfield in order to classify the HS type. Our sample size was relatively small and neuropsychological assessment could have been more comprehensive, including tests dedicated to different subsets of memory, such as spatial memory and discriminatory memory. As control hippocampi came from a bank based on autopsies in cases of natural death [19], they did not have formal cognitive assessment.

The strengths of the study include a careful quantitative morphometric assessment of glial proteins in HS samples, and a well-clinically characterized sample of patients with drug resistant TLE.

In conclusion, our data suggest association between microgliosis, but not astrogliosis, with the acquisition and consolidation of visual memory in TLE-HS.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the PhD scholarship. This study was funded by CNPq and FAPEMIG.

**Conflict of interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

### **REFERENCES**

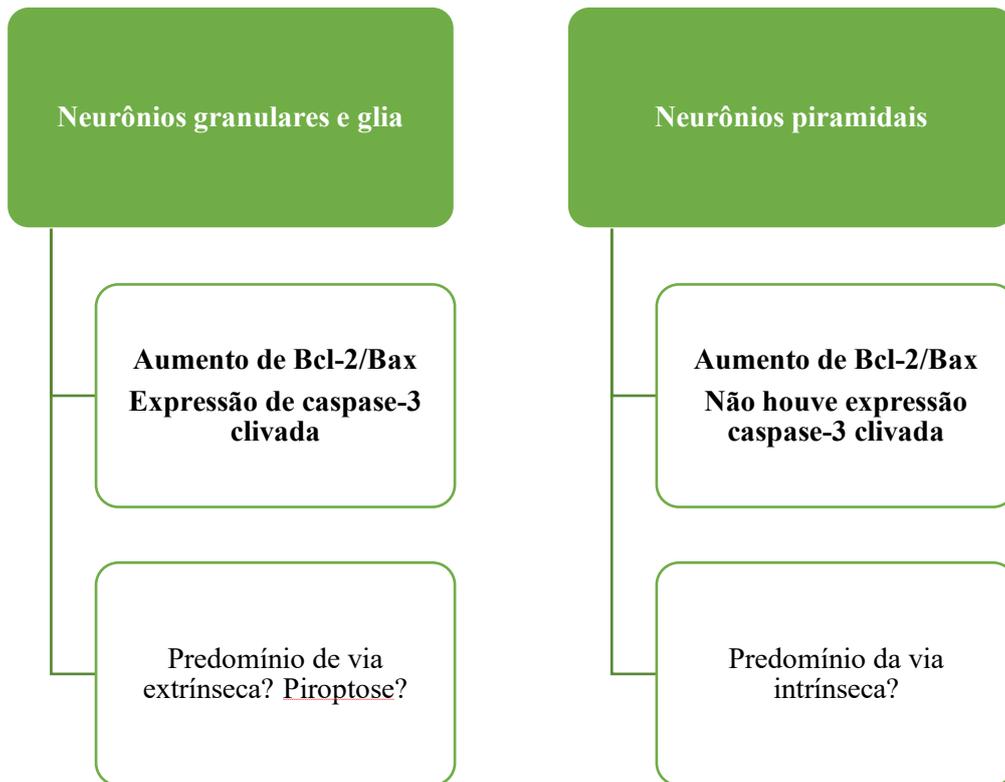
- [1] Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, *et al.* International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* 2013;54: 1315-1329.
- [2] Voss JL, Bridge DJ, Cohen NJ, Walker JA. A closer look at the hippocampus and memory. *Trends in cognitive sciences* 2017;21: 577-588.
- [3] Lisman J, Cooper K, Sehgal M, Silva AJ. Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability. *Nature neuroscience* 2018;21: 309.
- [4] Rausch R, Babb TL. Hippocampal neuron loss and memory scores before and after temporal lobe surgery for epilepsy. *Archives of Neurology* 1993;50: 812-817.
- [5] Coras R, Pauli E, Li J, Schwarz M, Rössler K, Buchfelder M, *et al.* Differential influence of hippocampal subfields to memory formation: insights from patients with temporal lobe epilepsy. *Brain* 2014;137: 1945-1957.
- [6] Comper SM, Jardim AP, Corso JT, Gaça LB, Noffs MHS, Lancellotti CLP, *et al.* Impact of hippocampal subfield histopathology in episodic memory impairment in mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. *Epilepsy & Behavior* 2017;75: 183-189.
- [7] Prada Jardim A, Liu J, Baber J, Michalak Z, Reeves C, Ellis M, *et al.* Characterising subtypes of hippocampal sclerosis and reorganization: correlation with pre and postoperative memory deficit. *Brain Pathology* 2018;28: 143-154.
- [8] Rodrigues GR, Kandratavicius L, Peixoto-Santos JE, Monteiro MR, Gargaro AC, Geraldi CdVL, *et al.* Increased frequency of hippocampal sclerosis ILAE type 2 in patients with mesial temporal lobe epilepsy with normal episodic memory. *Brain* 2014;138: e359-e359.
- [9] Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends in neurosciences* 2013;36: 174-184.
- [10] Walker L, Sills GJ. Inflammation and Epilepsy: The Foundations for a New Therapeutic Approach in Epilepsy? *Inflammation and Epilepsy. Epilepsy currents* 2012;12: 8-12.
- [11] Dallérac G, Rouach N. Astrocytes as new targets to improve cognitive functions. *Progress in neurobiology* 2016;144: 48-67.
- [12] Sajja VS, Hlavac N, VandeVord PJ. Role of glia in memory deficits following traumatic brain injury: biomarkers of glia dysfunction. *Frontiers in integrative neuroscience* 2016;10: 7.
- [13] Gelders G, Baekelandt V, Van der Perren A. Linking neuroinflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Journal of immunology research* 2018;2018.
- [14] Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* 2016;353: 777-783.

- [15] Faden AI, Loane DJ. Chronic neurodegeneration after traumatic brain injury: Alzheimer disease, chronic traumatic encephalopathy, or persistent neuroinflammation? *Neurotherapeutics* 2015;12: 143-150.
- [16] Engel J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001;42: 796-803.
- [17] de Oliveira GN, Lessa JM, Goncalves AP, Portela EJ, Sander JW, Teixeira AL. Screening for depression in people with epilepsy: comparative study among neurological disorders depression inventory for epilepsy (NDDI-E), hospital anxiety and depression scale depression subscale (HADS-D), and Beck depression inventory (BDI). *Epilepsy Behav* 2014;34: 50-4.
- [18] Toscano ECB, Vieira ELM, Portela A, Reis JLJ, Caliar MV, Giannetti AV, *et al.* Bcl-2/Bax ratio increase does not prevent apoptosis of glia and granular neurons in patients with temporal lobe epilepsy. 2019.
- [19] Grinberg LT, de Lucena Ferretti RE, Farfel JM, Leite R, Pasqualucci CA, Rosemberg S, *et al.* Brain bank of the Brazilian aging brain study group—a milestone reached and more than 1,600 collected brains. *Cell and tissue banking* 2007;8: 151-162.
- [20] Costa CAX, Nunes AC, Ferreira AJ, Gomes MA, Caliar MV. Entamoeba histolytica and E. dispar trophozoites in the liver of hamsters: in vivo binding of antibodies and complement. *Parasites & Vectors* 2010;3: 23-23.
- [21] Wechsler D. Wechsler memory scale. 1945.
- [22] Wechsler D. Wechsler memory scale-revised. Psychological Corporation 1987.
- [23] Strauss E, Sherman EM, Spreen O. A compendium of neuropsychological tests: Administration, norms, and commentary: American Chemical Society; 2006.
- [24] Bell B, Lin JJ, Seidenberg M, Hermann B. The neurobiology of cognitive disorders in temporal lobe epilepsy. *Nature Reviews Neurology* 2011;7: 154.
- [25] Squire LR, Stark CE, Clark RE. The medial temporal lobe. *Annu. Rev. Neurosci.* 2004;27: 279-306.
- [26] Pauli E, Hildebrandt M, Romstöck J, Stefan H, Blümcke I. Deficient memory acquisition in temporal lobe epilepsy is predicted by hippocampal granule cell loss. *Neurology* 2006;67: 1383-1389.
- [27] Stefan H, Hildebrandt M, Kerling F, Kasper B, Hammen T, Doerfler A, *et al.* Clinical prediction of postoperative seizure control: structural, functional findings and disease histories. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2009;80: 196-200.
- [28] Thom M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014;40: 520-43.
- [29] Engel T, Henshall DC. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* 2009;1: 97.
- [30] Fiala M, Avagyan H, Merino JJ, Bernas M, Valdivia J, Espinosa-Jeffrey A, *et al.* Chemotactic and mitogenic stimuli of neuronal apoptosis in patients with medically intractable temporal lobe epilepsy. *Pathophysiology* 2013;20: 59-69.
- [31] Vieira ELM, de Oliveira GNM, Lessa JMK, Gonçalves AP, Oliveira ACP, Bauer ME, *et al.* Peripheral leukocyte profile in people with temporal lobe epilepsy reflects the associated proinflammatory state. *Brain, behavior, and immunity* 2016;53: 123-130.
- [32] Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* 2016;353: 777-83.
- [33] Ransohoff RM, El Khoury J. Microglia in health and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2016;8: a020560.
- [34] Ransohoff RM. Specks of insight into Alzheimer's disease. In: Nature Publishing Group; 2017.
- [35] Kaur K, Gill JS, Bansal PK, Deshmukh R. Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2017;381: 308-314.
- [36] McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988;38: 1285-91.

- [37] Braak H, Sastre M, Del Tredici K. Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2007;114: 231-41.
- [38] Edison P, Donat CK, Sastre M. In vivo Imaging of Glial Activation in Alzheimer's Disease. *Frontiers in neurology* 2018;9: 625-625.
- [39] Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* 2015;14: 388-405.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

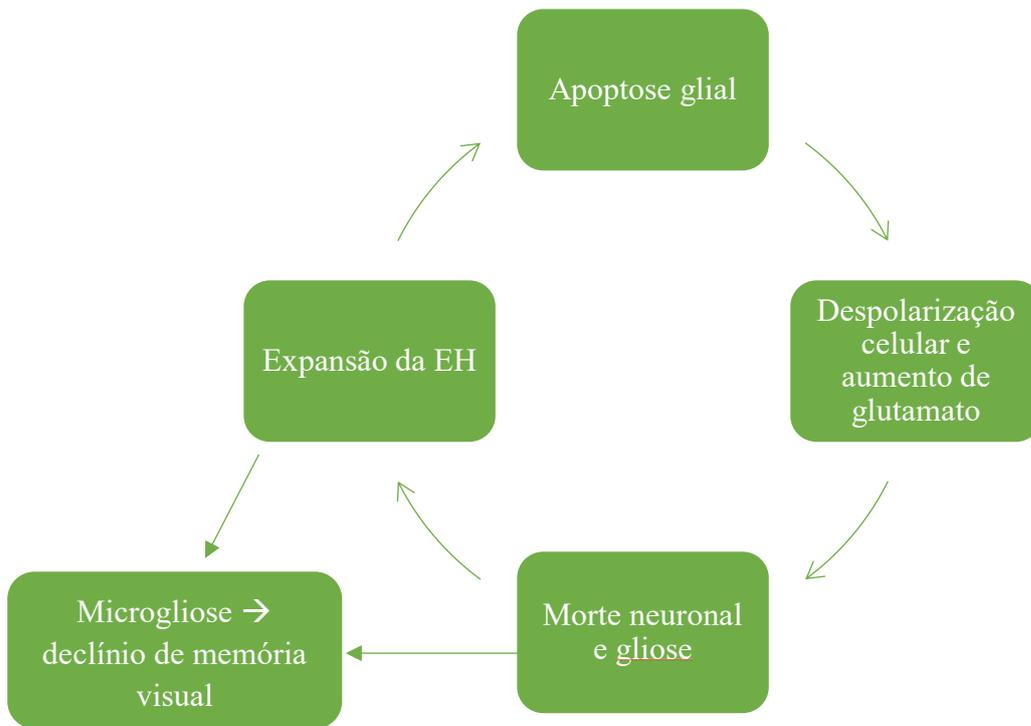
No presente estudo, foi realizada a caracterização histopatológica inédita, incluindo a classificação do tipo de EH, dos hipocampos escleróticos, provenientes de pacientes com ELT do HC-UFMG e do Hospital Felício Rocho, ambos referência no tratamento de epilepsia e no procedimento de amigdalohipocampectomia seletiva em Minas Gerais. Em consonância com a literatura, demonstrou-se que a EH tipo 1 predomina na população estudada. Realizou-se uma criteriosa seleção dos fragmentos hipocampais, aspecto essencial para uma classificação confiável da EH, que foi comprovada pela imunomarcagem de NeuN e GFAP, conforme preconizado pela ILAE. As análises morfométricas foram feitas estritamente dentro da área de EH e revelaram gliose similar na EH tipo 1 e na EH tipo 2, aumentada em relação aos hipocampos controles. Demonstrou-se ainda, pela primeira vez, que a intensidade e não somente a extensão da imunomarcagem de HLA-DR está associada à ELT, em ambos os tipos de EH. Com relação aos mecanismos apoptóticos, observou-se aumento da razão Bcl-2/Bax nos hipocampos escleróticos, indicando predomínio de inibição da via intrínseca da apoptose. Entretanto, células gliais e neurônios granulares permanecem expressando caspase-3 clivada. Por outro lado, os neurônios piramidais remanescentes na região de EH não expressam caspase-3 clivada, proteína cuja expressão também não foi observada nos hipocampos controles. Esses dados sugerem a atuação de diferentes vias de morte em neurônios piramidais, neurônios granulares e células gliais (Figura 7). Além disso, observou-se que a apoptose glial está co-localizada com as áreas de maior perda neuronal e gliose. Demonstrou-se, ainda, a associação da microgliose, mas não da astrogliose, com declínio da memória visual (imediate e consolidada) em pacientes com ELT, o qual não foi dependente do tipo de EH. Por outro lado, a memória verbal (lógica) não foi afetada pela microgliose. Não há estudos prévios avaliando a relação da glia com disfunções cognitivas na ELT.



**Figura 7 – Possíveis vias de morte celular envolvidas na perda de neurônios piramidais, neurônios granulares e células da glia em hipocampus escleróticos de pacientes com ELT.**

ELT: epilepsia do lobo temporal

Dessa forma, o presente estudo evidencia o intricado equilíbrio entre neurônios e glia na ELT e a relação cíclica entre apoptose neuronal/glial e gliose, contribuindo para expansão da EH. Sabe-se que a EH está associada a declínios cognitivos encontrados na clínica. No presente trabalho, demonstrou-se, pela primeira vez, que a microgliose também está associada e correlacionada com déficits de memória visual em pacientes com ELT (Figura 8).



**Figura 8 – Relação entre apoptose glial e expansão da EH, possivelmente, culminando em declínio da memória visual em pacientes com ELT.** Além da morte neuronal, a microgliose (mas não a astrogliose) parece contribuir para um pior prognóstico cognitivo na ELT.

EH: esclerose hipocampal, ELT: epilepsia do lobo temporal

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Conclui-se que o predomínio de sinal anti-apoptótico em relação ao pró-apoptótico, de via intrínseca, nos hipocampos de pacientes com ELT comparados aos controles não impede a apoptose de células gliais e neurônios granulares do giro dentado. Trata-se do primeiro estudo em ELT-EH a compilar a avaliação da morte desses tipos celulares separadamente, mensurando a razão entre Bcl-2 e Bax. Conclui-se também que, a microgliose está associada a uma pior performance dos pacientes com ELT e EH no teste de Reprodução Visual, evidenciando a relação entre marcadores de lesão central e parâmetros clínicos. Considerando que a memória é a principal área impactada dentro da cognição nestes pacientes e que esses impactos refletem em uma redução expressiva da qualidade de vida dos mesmos, é essencial um olhar mais aprofundado sobre a relação microgliose-memória para uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais a EH afeta a aquisição e consolidação da memória.

Portanto, a presente tese contribui para a caracterização e entendimento dos mecanismos de morte celular e ativação glial envolvidos na ELT associada à EH, bem como para o estabelecimento da relação deles com importantes parâmetros clínicos, como tempo de doença, frequência de crises e, principalmente, prejuízos da memória verbal e visual.

O estudo da via do inflamassoma (NLRP1, NLRP3, IL-1 $\beta$ , IL-18 e caspase-1) e a avaliação de proteínas indicativas de processos de neurodegeneração ativa (proteínas tau forsorilada e TDP-43) nos fragmentos de hipocampos escleróticos e sangue periférico, comparados a hipocampos e sangue de indivíduos controles, são as principais perspectivas para a continuidade deste trabalho.

## 8. ARTIGOS COM TEMA RELACIONADO À TESE

- a. Reis, J.L.J; Diniz, A. C. P.; Vieira, Érica Leandro Marciano; Gonçalves, A. P.; Giannetti, Alexandre Varella; Teixeira, A. L.; Rachid, Milene; **Toscano, Eliana Cristina De Brito**. Pharmacotherapeutic characterization and post-surgical outcome evaluation of patients with drug-resistant Temporal Lobe Epilepsy of HC-UFMG. REVISTA MÉDICA DE MINAS GERAIS, v. 2019, n. 29, 2017.
  
- b. **Toscano, Eliana Cristina De Brito**; Lessa, João Marcelo Korcsik; Gonçalves, Ana Paula; Rocha, Natalia Pessoa; Giannetti, Alexandre Varella; De Oliveira, Guilherme Nogueira; Rachid, Milene Alvarenga; Vieira, Érica Leandro Marciano; Teixeira, Antônio Lúcio. Circulating levels of adipokines are altered in patients with temporal lobe epilepsy. EPILEPSY & BEHAVIOR, v. 90, p. 137-141, 2019.

## ANEXO 1

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos pacientes participantes do estudo.**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

##### *Aspectos Inflamatórios e Clínicos em Pacientes Portadores de Epilepsia*

**Introdução:** Você está sendo convidado a participar desta pesquisa clínica. É muito importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos antes de aceitar participar da mesma. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e riscos do estudo, e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento. Se, ainda assim, persistirem dúvidas a respeito do estudo, pergunte ao pesquisador responsável.

**Objetivo:** O objetivo deste estudo é avaliar os níveis de determinadas substâncias (citocinas/quimiocinas) no plasma e nos glóbulos brancos do sangue de pacientes portadores de epilepsia e em indivíduos controles. Além disso, serão avaliadas as mesmas substâncias no tecido do cérebro somente de pacientes portadores de epilepsia que necessitem de cirurgia por indicação médica e que aceitem participar dessa pesquisa. Esse estudo buscará identificar variações na quantidade de expressão dessas moléculas entre os pacientes portadores de epilepsia e indivíduos controles sem essa doença, o que poderá contribuir para a sua diferenciação e para o maior entendimento das epilepsias e busca por novas terapias.

**Resumo:** A epilepsia é uma das desordens neurológicas mais comuns. A epilepsia é uma síndrome neurológica caracterizada pela recorrência de crises convulsivas não provocadas. A epilepsia é uma doença bastante complexa e resultante da combinação de fatores genéticos, ambientais e infecciosos. Recentemente, discute-se a possível contribuição de mecanismos inflamatórios nas epilepsias.

**Procedimentos:** Este estudo irá consistir de uma avaliação clínica padronizada realizada por profissional capacitado. Este profissional aplicará alguns questionários e testes para investigar a presença de alterações cognitivas e do comportamento. Posteriormente, será realizada coleta de 20,0 mL de sangue com material descartável apropriado. Esse sangue será encaminhado para o estudo laboratorial. A coleta de sangue venoso implica em risco

mínimo de acidente de punção, caracterizado por extravasamento sanguíneo para o tecido debaixo da pele, provocando uma pequena “mancha roxa” no local. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por profissional treinado, com capacidade técnica e experiência que estará atento e tomará todas as providências necessárias. O tecido cerebral será coletado apenas nos indivíduos que realizarem a cirurgia de epilepsia após avaliação e indicação da equipe de Neurocirurgia, e que aceitarem participar da pesquisa previamente. A retirada do tecido ocorrerá de forma independente da realização da pesquisa, como procedimento médico padrão dessa cirurgia. Nos indivíduos participantes da pesquisa que realizarem a cirurgia de epilepsia e que consentiram em participar do estudo, parte do tecido será destinada à avaliação de moléculas inflamatórias, e outra parte será destinada a análise histopatológica, seguindo protocolo padrão do serviço médico. Após a avaliação e laudo da equipe de patologia, o bloco histopatológico poderá ser utilizado nesta pesquisa para avaliações futuras. Independentemente da participação na pesquisa, os procedimentos clínicos e cirúrgicos necessários ao cuidado dos pacientes serão mantidos.

***Crítérios de inclusão:*** Serão incluídos pacientes de ambos os sexos com o diagnóstico estabelecido de epilepsia e que pretendam participar do estudo. Para fins de comparação, também serão incluídos voluntários hígidos (ver ***Grupo Controle***).

***Grupo Controle:*** Este grupo constitui-se dos voluntários que não apresentam diagnóstico para epilepsias ou qualquer outra doença neurodegenerativa ou psiquiátrica. Os dados provenientes dos participantes desse grupo serão utilizados apenas para fim de comparação com os grupos de pacientes supracitados.

***Benefícios:*** Não haverá compensação financeira pela sua participação, nem remuneração financeira do pesquisador, cujo interesse é apenas científico. O participante não terá nenhum benefício direto além de estar contribuindo para o desenvolvimento científico e a melhor compreensão das epilepsias. A participação no estudo também não implicará em ônus financeiro (despesas) para você.

***Confidencialidade:*** Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. No entanto, o pesquisador e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, além da

divulgação dos dados desta para o meio científico desde que não haja quebra de confidencialidade.

**Desligamento:** A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

**Emergência / contato com a Comissão de Ética:** É garantido seu direito a respostas a eventuais dúvidas que surgirem durante o estudo. Assim, se você tiver qualquer dúvida ou apresentar qualquer problema médico, contate o Prof. Antônio Lúcio Teixeira ou a Dra. Érica Leandro Marciano Vieira pelo telefone (31) 3409-8073 ou o Comitê de Ética em Pesquisa (COEP/UFMG) no telefone (31) 3409-4592. O COEP/UFMG localiza-se na Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º. Andar, Campus Pampulha da UFMG, Belo Horizonte, CEP31270-901.

**Consentimento:** Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para participar do estudo, até que eu decida o contrário.

### TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que, após convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, autorizo a coleta de 20,0 mL de sangue e, **apenas nos casos de realização de cirurgia de epilepsia**, de parte do tecido cerebral fresco e do bloco histológico para ser utilizado na pesquisa descrita acima.

Nome do voluntário participante: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura do voluntário participante: \_\_\_\_\_

Nome médico ou pesquisador responsável:

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura do médico responsável:

\_\_\_\_\_

## ANEXO 2

**Aspectos éticos:** esse estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, sob o protocolo 1.939.783

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Aspectos Inflamatórios e Clínicos em Pacientes com Epilepsia

**Pesquisador:** Antonio Lucio Teixeira Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 07509812.0.0000.5149

**Instituição Proponente:** PRO REITORIA DE PESQUISA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.939.783

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_804699 E2.pdf	06/02/2017 16:00:10		Aceito
Outros	JustificativaEmenda_2017.pdf	06/02/2017 15:58:49	Antonio Lucio Teixeira Junior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PlataformaBrasil_2017.doc	06/02/2017 15:57:31	Antonio Lucio Teixeira Junior	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_596911_RE.pdf	06/02/2017 14:25:38	Antonio Lucio Teixeira Junior	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_Neurocirurgia_HC.pdf	03/02/2017 13:43:45	Antonio Lucio Teixeira Junior	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_Neurocirurgia_Felicio.pdf	03/02/2017 13:42:38	Antonio Lucio Teixeira Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Epilepsia_Novo.doc	03/02/2017 13:40:07	Antonio Lucio Teixeira Junior	Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto.pdf	30/10/2012 21:14:18		Aceito
Outros	075098120emendaassinada.pdf	23/02/2017 09:58:32	Vivian Resende	Aceito
Outros	075098120parecerassinado.pdf	23/02/2017 09:58:39	Vivian Resende	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 23 de Fevereiro de 2017