



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM HIPOCAMPO DE
PACIENTES COM EPILEPSIA MESIAL DO LOBO TEMPORAL
Sugestões para a Aplicabilidade de Testes de Memória Pós-Cirurgia

Agosto/2019
Belém – PA



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM HIPOCAMPO DE
PACIENTES COM EPILEPSIA MESIAL DO LOBO TEMPORAL
Sugestões para a Aplicabilidade de Testes de Memória Pós-Cirurgia

Laize Souto Farage de Sousa

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Silene Maria Araújo de Lima

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Leda de Faria Brino

Agosto/2019

Belém – PA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S726a Souto Farage de Sousa, Laize
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TGF BETA EM
HIPOCAMPO DE PACIENTES COM EPILEPSIA MESIAL DO
LOBO TEMPORAL / Laize Souto Farage de Sousa. — 2019.
54 f. : il. color.

Orientador(a): Profª. Dra. Silene Maria Araújo de Lima
Coorientação: Profª. Dra. Ana Leda de Faria Brino
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Comportamento, Núcleo de Teoria e Pesquisa do
Comportamento, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Epilepsia. 2. Neuroinflamação. 3. Neurodegeneração. 4.
Micrógliã. 5. Micrógliã Destrófica. I. Título.

CDD 150

Laize Souto Farage de Sousa

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM HIPOCAMPO DE
PACIENTES COM EPILEPSIA MESIAL DO LOBO TEMPORAL
Sugestões para a Aplicabilidade de Testes de Memória Pós-Cirurgia

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Candidata: Laize Souto Farage de Sousa

Data da defesa:

Resultado:

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Silene Maria Araújo de Lima – Orientadora
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Ana Leda de Faria Brino - Coorientadora
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Edna Cristina Santos Franco – Membro titular
Instituto Evandro Chagas

Profa. Dr. Paulo Roney Kilpp Goulart – Membro titular
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha - Membro suplente
Universidade Federal do Pará

Agosto/2019

Belém – PA

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Agradeço a Ele, também, por me amparar em vários momentos difíceis que surgiram durante essa trajetória.

Agradeço a minha mãe, Enedina Souto, pela força, dedicação e determinação que me ensinou durante todos os dias da minha vida. Obrigada por sempre me apoiar, vibrar com todas as minhas vitórias e por ser meu alicerce de todas as horas. A minha irmã, Leize Farage, pelas inúmeras vezes em que disponibilizou tempo para corrigir minha dissertação, para escutar as minhas apresentações e para me orientar em alguma dúvida. Obrigada por ser essa irmã a quem posso recorrer. Ao meu irmão, Gabriel Lucas, por ser minha companhia de várias madrugadas de estudos e por me ajudar, mesmo que indiretamente, com o meu bem-estar mental, muitas vezes me fazendo sorrir. A vocês, eu só posso agradecer pelo incentivo, apoio e amor de sempre.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Silene Lima, por ter me acolhido desde a primeira entrevista. Por ter acreditado que eu, mesmo sem experiência em laboratórios, conseguiria aprender e dar conta do que poderia vir pela frente. Obrigada por ser essa mãezona, que puxa a orelha, mas que também abraça e defende. Obrigada por me entender algumas dificuldades pelas quais passei e por me tranquilizar quando eu achei que tudo estava dando errado. Obrigada por fazer meu sonho de entrar na vida científica virar realidade e, acima de tudo, por acreditar em mim.

Agradeço a Profa. Dra. Ana Leda Brino, por conseguir transformar a análise do comportamento em algo compreensível aos meus olhos. Obrigada pelos ensinamentos nessa área que eu me apaixonei, apesar de toda dificuldade em compreender. Obrigada por ser essa profa compreensiva, que se adaptou várias vezes às mudanças do meu projeto para que tudo fluísse da melhor maneira possível. Obrigada pelas diversas situações em que me acalmou, sempre me mostrando que sempre tem uma luz no fim do túnel.

Agradeço a Prof^a Dr^a Edna Franco, pela disponibilidade de acesso ao Instituto Evandro Chagas, local onde eu aprendi muito e que foi essencial para o desfecho dessa pesquisa. Obrigada pelas conversas, pelos conselhos quando eu pensei em desisti e por sempre estar disposta em explicar, fazer e refazer experimentos, procurar alternativas para os problemas que surgiram no caminho e, acima de tudo, por ser essa profa que está sempre disponível para colaborar e contribuir com a ciência e os alunos. Agradeço aos funcionários do Instituto Evandro Chagas, por terem me recebido de braços abertos e por serem, sempre, muito solícitos. Obrigada a todos que contribuíram para que eu chegasse aqui hoje.

Agradeço, também, ao Grupo de pesquisa Epilepsia Norte, em especial ao professor Wallace Gomes-Leal, o qual contribuiu com a análise dos dados desta pesquisa. Obrigada pela disponibilidade do laboratório, do seu tempo em ensinar e analisar cada lâmina comigo e por todas as dúvidas sanadas. Agradeço a todos os membros do grupo pela troca de conhecimento e pelos debates sobre epilepsia a cada reunião.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, Jéssica Gama e Giuliana Modesto pelo apoio de todas as horas e por sempre estarem dispostas a me ajudar e colaborar com essa pesquisa. Ao Igor Tagore e Bruno Ponciano, meu agradecimento pelas conversas, trocas de conhecimento durante todos esses anos. Agradeço a vocês por todas as discussões, colaborações e risadas de cada dia. Agradeço aos meus amigos que acreditaram em mim e me ajudaram a continuar nessa caminhada.

Agradeço ao CNPq e a FAPESPA pelo auxílio parcial a essa pesquisa através da concessão de bolsa de estudos. Obrigada a todos que, de alguma maneira, apoiaram, incentivaram e/ou viabilizaram a realização deste projeto.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”
(Marcel Proust)

Resumo

A neuroinflamação é um evento secundário importante da fisiopatologia dos distúrbios neurais agudos e crônicos. Ele compreende componentes humorais e celulares dos sistemas imunes inato e adaptativo. A ativação microglial é um evento crucial nos distúrbios neuronais crônicos, com consequências deletérias e/ou benéficas. Na epilepsia, uma reação microglial intensa e de longa duração tem sido descrita usando modelos experimentais de status epilepticus, o que indica um importante papel da microgliose no dano neuronal. No entanto, os padrões de ativação microglial não foram sistematicamente investigados no cérebro de pacientes humanos com diferentes graus de esclerose hipocampal devido à epilepsia do lobo temporal (ELT). Neste estudo, explorou-se o padrão de reação microglial no hipocampo de pacientes com ELT com diferentes histórias clínicas e submetidos a hipocampectomia unilateral para tratamento de ELT refratária. Amostras de hipocampo foram obtidas através da ressecção desse hipocampo. Foram utilizados o tecido de um paciente que apresentou a primeira convulsão na infância, a qual se tornou contínua (P4) e de um paciente com latência de décadas após a primeira convulsão (P5). As amostras de tecido removidas durante a cirurgia foram coletadas em solução salina estéril e logo após foram colocadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas. Após esse período, as amostras de tecido dos pacientes P4 e P5 foram crioprotetidas em diferentes gradientes de solução de glicerol e sacarose por duas semanas e cortadas usando um criostato a 40 µm de espessura. As secções foram submetidas à imunohistoquímica para imunomarcagem de microglia (anti-Iba1) e citocina anti-inflamatória (TGF-β). Ativação microglial generalizada com diferentes graus de microgliose estava presente no hipocampo dos pacientes P4 e P5. No entanto, a reação microglial foi mais intensa em P4, caracterizada por um número considerável de microglia degenerativa e distrófica e células bastonetes. As células positivas para TGF-β estavam conspicuamente presentes no hipocampo de ambos os pacientes em cavidades parecidas com clusters e distribuídas de forma esparsa sobre o parênquima do hipocampo. A história clínica de cada paciente, com mais ou menos convulsões ao longo do tempo, parece induzir padrões diferenciais de resposta microglial durante ELT. No presente estudo, o paciente com crises contínuas durante muitos anos, sem latência, apresentou intensa ativação microglial, distrofia e degeneração que se assemelham aos achados patológicos presentes na DA. Reações antiinflamatórias por células não microgliais também estavam presentes, como sugerido pela presença generalizada de células positivas para TGF-β sobre o parênquima do hipocampo.

Palavras-chave: Epilepsia, Neuroinflamação, Neurodegeneração, Microglia, Microglia Distrofica.

Abstract

Neuroinflammation is a major secondary event of the pathophysiology of acute and chronic neural disorders. It contains humoral and cellular components of the innate and adaptive immune systems. Microglial activation is a crucial event in chronic neuronal disorders with deleterious and/or beneficial consequences. Alzheimer's disease (AD) microglia can be beneficial by phagocytizing amyloid plaques, but may contribute to neuronal damage and a pro-inflammatory phenotype, depending on the disease progression. In epilepsy, an intense and long-lasting microglial reaction has been described using experimental models of status epilepticus, which indicates an important role of microgliosis in neuronal damage. However, microglial activation patterns were not systematically investigated in the brains of human patients with different degrees of hippocampal sclerosis due to temporal lobe epilepsy (TLE). In this study, we explored the pattern of microglial reaction in the hippocampus of TLE patients with different clinical histories and submitted to unilateral hippocampectomy for treatment of refractory TLE. Hippocampal samples were obtained through the resection of this hippocampus. The tissue of a patient who presented the first seizure in childhood, which became continuous (P4) and a patient with latency of decades after the first seizure (P5) was used. Tissue samples removed during surgery were collected in sterile saline solution and then placed in 4% paraformaldehyde for 24 hours. After this time, tissue samples from patients P4 and P5 were cryoprotect in different gradients of glycerol and sucrose solution for two weeks and cut using a 40 μm thick cryostat. The sections were submitted to immunohistochemistry for microglia (anti-Iba1), proinflammatory cytokine (IL-1 β) and anti-inflammatory cytokine (TGF- β). Generalized microglial activation with different degrees of microgliosis was present in the hippocampus of patients P4 and P5. However, the microglial reaction was intense in P4, characterized by a considerable number of degenerative and dystrophic microglia and rod cells. TGF- β positive cells were conspicuously present in the hippocampus of both patients in clusters-like cavities and sparsely distributed over the parenchyma of the hippocampus. IL-1 β positive cells were not present. The clinical history of each patient, with more or less convulsions over time, seems to induce differential patterns of microglial response during TLE. In the present study, the patient with continuous seizures for many years, without latency, presented intense microglial activation, dystrophy and degeneration that resemble the pathological findings present in AD. Anti-inflammatory reactions by non-microglial cells were also present, as suggested by the generalized presence of TGF- β -positive cells on the hippocampus parenchyma.

Key-words: Epilepsy, Neuroinflammation, Neurodegeneration, Microglia, Dystrophic Microglia.

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes P4 e P5.(Adaptado de Gama, 2018).....	27
Tabela 2. Fabricante, diluição utilizada e marcação específica de cada anticorpo primário.....	30
Tabela 3 Número de células / mm ² e valor de <i>p</i> para as marcações de anti-Iba1 nas três regiões hipocâmpais dos pacientes P4 e P5.....	35
Tabela 4. Número de células / mm ² e valor de <i>p</i> para as marcações de anti-Iba1 para micróglia distrófica nas três regiões hipocâmpais dos pacientes P4 e P5.....	36
Tabela 5. Número de células anti-TGF β / mm ² e valor de <i>p</i> nas três regiões hipocâmpais dos pacientes P4 e P5.....	37

Lista de figuras

Figura 1. Desenho ilustrativo de micróglia em diferentes estados de ativação. A: Desenho ilustrativo de uma micróglia em estado estacionário. B: Desenho ilustrativo de uma micróglia em estado ativado.....	17
Figura 2. Subpopulações de micróglia - estado M1 (pró-inflamatório) ou M2 (anti-inflamatório), dependendo da natureza do estímulo.....	19
Figura 3. Esquema do hipocampo e giro denteado. Circuito tri-sináptico simplificado do hipocampo. Fonte: www.uni-leipzig.de/.../graphic_hippo_farbig.html	21
Figura 4. Fotomicrografias da área hipocampal dos tecidos de P4 e P5 com marcação de Nissl para visualização de gliose hipocampal. A área 4A corresponde ao tecido e a gliose hipocampal do paciente P4 e a área B, ao tecido e gliose hipocampal do paciente P5.....	32
Figura 5. Fotomicrografias da área hipocampal dos tecidos de P5 com marcação de Nissl para visualização de esclerose hipocampal.....	32
Figura 6. Fotomicrografias da área hipocampal dos tecidos de P4 e P5 com marcação de anti-Iba-1 para visualização de micróglia distrófica. A área A é referente ao paciente P4 e a área B, ao paciente P5.....	33
Figura 7. Fotomicrografias da área hipocampal dos tecidos de P4 e P5 com marcação de anti-TGF β para visualização de citocinas anti-inflamatórias. As áreas A e C correspondem ao paciente P4 e as áreas B e D ao paciente P5. A seta preta na área C representa a marcação positiva de TGF β	34
Figura 8. Número de células de anti-Iba-1 positivo / mm ² para os pacientes P4 e P5 em cada área do hipocampo (CA1, CA3 e Giro denteado). Foram realizadas análises estatísticas para cada área do hipocampo.....	34
Figura 9. Número de micróglia distrófica / mm ² para os pacientes P4 e P5 em cada área do hipocampo (CA1, CA3 e Giro denteado). Foram realizadas análises estatísticas para cada área do hipocampo.....	35

- Figura 10.** Número de células TGF β positivas / mm^2 para cada área do hipocampo (CA1, CA3 e Giro denteado). Foram realizadas análises estatísticas para cada área do hipocampo..36
- Figura 11.** População total de células positivas de anti-Iba-1 e anti-TGF β nos tecidos dos pacientes P4 e P5. Foram analisadas todas as áreas do hipocampo de P4 e P5.....37
- Figura 12.** Representação em pizza com a população total de anti- Iba-1 e a porcentagem para cada área do hipocampo. Cada área do hipocampo é representada com sua respectiva porcentagem e número total de células da área, bem como o número de células total do hipocampo.....38
- Figura 13.** Representação em pizza com a população total de anti-TGF β e a porcentagem para cada área do hipocampo. Cada área do hipocampo é representada com sua respectiva porcentagem e número total de células da área, bem como o número de células total do hipocampo.....39

Sumário

Introdução.....	13
Geral	25
Específicos	25
Método	26
Participantes	26
Procedimento	27
Obtenção do tecido e preparo histológico	28
Coloração de Nissl.....	28
Processamento Imunohistoquímico.....	29
Análise morfológica do hipocampo	31
Análise qualitativa.....	31
Análise quantitativa.....	31
Análise Estatística.....	32
Resultados	32
Achados patológicos	32
Padrão de imunoreatividade de anti-Iba-1 e anti-TGF β em hipocampos de pacientes com ELT.....	33
Análise quantitativa do padrão de imunoreatividade para Anti-Iba-1 em diferentes regiões hipocampais	35
Discussão.....	40
Aspectos patológicos evidenciados pela coloração de Nissl	40
Aspectos gerais da marcação imunohistoquímica.....	41
Aspectos gerais do padrão comportamental	43
Referências	45
ANEXOS.....	53

Introdução

A epilepsia é a doença neurológica mais comum e afeta, aproximadamente, 50 milhões de pessoas em todo o mundo. De acordo com estudos epidemiológicos, existem de 16 a 51 casos/100.000 pessoas a cada ano. Apesar da escassez de estudos no Brasil, estima-se que a epilepsia atinja de 2% a 4% da população, acometendo pessoas em diferentes idades e classes sociais. Um grande número de doenças ou lesões cerebrais pode causar epilepsia, e as mais frequentes são: anomalia cerebral durante o desenvolvimento, traumatismo craniano, hemorragias, anóxia durante o parto, tumores, infecção cerebral, crises prolongadas e crises febris (Fernandes, 2013; Gao et al., 2017; Sander & Shorvon, 1996).

A epilepsia é caracterizada como um distúrbio cerebral causado pela predisposição permanente do cérebro em gerar crises epiléticas espontâneas, recorrentes, acompanhadas de consequências neurobiológicas, cognitivas e psicossociais. É definida, também, pela ocorrência de duas crises epiléticas não provocadas, separadas por um intervalo de mais de 24 horas. Quando essas crises ocorrem nesse intervalo, mesmo que assumam a forma de estado de mal epilético, não são suficientes para o diagnóstico de epilepsia (Fisher et al., 2005; Yacubian & Kochen, 2014).

A crise epilética é definida como a ocorrência momentânea de sinais e/ou sintomas decorrentes de atividade neuronal conjunta ou excessiva no cérebro. Esses sinais ou sintomas incluem fenômenos anormais de início rápido e efêmero, os quais podem incluir alterações da consciência, eventos motores, sensitivos e/ou sensoriais, autonômicos ou psíquicos involuntários percebidos pelo paciente ou por um observador. Essas manifestações caracterizam o que é chamado de “Auras”, ou seja, seriam os componentes das crises que ocorrem antes da perda da consciência. Geralmente, o paciente é capaz de recordar esses sintomas que precedem o período pós-ictal, ou seja, após a crise epilética (Fernandes, 2013; Tanuri, Thomaz, & Tanuri, 2000; Yacubian & Kochen, 2014).

A classificação das crises epiléticas depende da localização, sendo que as crises podem ser focais, com início em uma região restrita do encéfalo, ou generalizadas, quando as descargas se originam concomitantemente nos dois hemisférios cerebrais. As crises focais são divididas em simples, quando há preservação da consciência durante o ictus (crise epilética), ou complexas, quando há perda de consciência. O diagnóstico necessário para a epilepsia engloba múltiplos níveis e as crises devem ser avaliadas de maneira global, ou seja, aliadas a dados do histórico de saúde, idade e resultados eletroencefalográficos (Fisher et al., 2014, 2018).

Dois terços dos pacientes obtêm controle das crises com o uso regular de drogas antiepiléticas (DAE) em mono ou politerapia. Entretanto, em aproximadamente 30% dos casos, os pacientes apresentam crises refratárias ao tratamento medicamentoso disponível no mercado. Nestes casos, os pacientes tornam-se candidatos ao tratamento cirúrgico, a hipocampectomia, que consiste na retirada do foco epilético. É importante ressaltar que existe um aumento da prevalência de distúrbios psiquiátricos, como depressão e ansiedade, nos portadores de epilepsia (24%) em comparação com a população geral (7%) e, dentre eles, os mais susceptíveis são os portadores de Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) e Epilepsia Refratária (Gaitatzis, Carroll, Majeed, & Sander, 2004; Schuele & Lüders, 2008; Spencer & Huh, 2008; Yroni, Arbus, Valton, & Schmitt, 2017).

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) caracteriza-se por uma esclerose hipocampal, com diferentes graus de comprometimento de estruturas adjacentes, identificada com perda neuronal e gliose hipocampal. A esclerose hipocampal pode ser unilateral ou bilateral, e quando é bilateral, frequentemente é assimétrica. Os pacientes com ELT apresentam, ainda, crises focais simples ou complexas que se originam em estruturas mesiais do lobo temporal, geralmente precedidas por auras que ocorrem em 20% a 90% destes pacientes (Fernandes, 2013; Tanuri et al., 2000).

A gliose hipocampal pode ser definida como o crescimento anormal, hipertrofia ou hiperplasia da microglia. Ocorre no SNC seguinte a qualquer dano tecidual, e caracteriza-se pela presença de grande número de astrócitos com aumento de tamanho, prolongamentos mais longos e grossos, e maior quantidade de manchas nos filamentos gliais. A esclerose hipocampal se caracteriza por uma grande perda neuronal na região do hipocampo. A alteração é observada através da diminuição significativa do volume da estrutura com desorganização das camadas celulares hipocampais (da Cunha et al., 1993; Laterza et al., 2018).

Um aumento crescente de evidências sugere que o processo inflamatório envolvido na fisiopatologia da epilepsia pode desempenhar papéis importantes na ictogênese (mecanismos de geração das crises em pacientes com epilepsia) e na epileptogênese (processo envolvido no desenvolvimento da epilepsia secundária a uma lesão cerebral). Essa contribuição deletéria da inflamação tem sido bem estabelecida para um número crescente de outros distúrbios neurológicos, como na Doença de Alzheimer (Choi & Koh, 2008; Gao et al., 2017; Valotta & Cabral, 2008).

Um estudo realizado em ratos objetivou examinar o impacto da inflamação periférica na suscetibilidade a convulsões e o envolvimento da neuroinflamação e estresse oxidativo no hipocampo. Foi observado que infusão de lipopolissacárideo de *Escherichia coli* (LPS) induziu inflamação periférica caracterizada pelo aumento dos níveis plasmáticos de interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Este resultado está associado a um aumento significativo no número da micróglia ativada (Iba-1 positivas), aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e estresse oxidativo tecidual (regulação do NADPH subunidades da oxidase) no hipocampo. Os resultados indicaram que a inflamação periférica induzida por LPS provocou neuroinflamação e o subsequente estresse oxidativo no hipocampo, resultando no aumento da suscetibilidade à

crise induzida por ácido kaínico (KA). Além disso, a proteção contra neuroinflamação e estresse oxidativo no hipocampo exerceu efeito benéfico sobre a suscetibilidade à convulsão após inflamação periférica (Ho et al., 2015).

Estudos com ratos indicaram também que em processos inflamatórios ocorre aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo. Esses processos podem estar envolvidos na fisiopatologia e patogênese da epilepsia. A inflamação induzida pela resposta imune inata através de células cerebrais (astrócitos, neurônios e micróglia) contribui para a produção de múltiplas citocinas que podem recrutar células do sistema imune adaptativo e levar à secreção de mais citocinas, desencadeando uma resposta inflamatória aumentada e desenvolvendo um papel importante em várias doenças do sistema nervoso central (Gao et al., 2017; Ho et al., 2015; Valotta & Cabral, 2008).

Monócitos e macrófagos são as principais células responsáveis pela homeostase tecidual e resposta imune, fornecendo a primeira linha de defesa contra patógenos. Os monócitos proveem um conjunto precursor de macrófagos que é recrutado após processos inflamatórios para mediar a defesa do hospedeiro contra patógenos, antígenos estranhos ou dano tecidual. A análise de grandes conjuntos de dados de expressão gênica de múltiplas células e tecidos revela conjuntos de genes que são corregulados com os fatores de transcrição que os regulam. Em macrófagos, os agrupamentos gênicos incluem genes específicos da linhagem, genes responsivos ao interferon, genes inflamatórios precoces e aqueles necessários para a endocitose e a função do lisossoma (Hoeksema & de Winther, 2016; Hume, 2015; Liu & Hong, 2014; Whelan et al., 2018).

Os macrófagos são deslocados até os tecidos e alteram sua função para lidar com uma ampla gama de desafios relacionados ao desenvolvimento e à organogênese, lesão tecidual, malignidade, estímulos inflamatórios estéreis ou patogênicos. Esses estímulos alteram a

expressão gênica para "macrófagos ativados", mais bem equipados para eliminar a causa de seu influxo e para restaurar a homeostase (Hume, 2015).

Os estados de ativação ou polarização dos macrófagos foram classificados como "clássicos" e "alternativos" ou M1 e M2. A ativação clássica corresponde ao fenótipo pro inflamatório (M1), caracterizada pela liberação de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 1 β (IL1- β) e radicais livres. Já o fenótipo anti-inflamatório (M2) é característico da reparação tecidual, onde há produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10) e liberação de fatores de transcrição como o fator de transformação de crescimento β (TGF β), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), além do aumento de expressão de arginase 1 (ARG1), e de marcadores de superfície, como o cluster de diferenciação 163 (CD163). O óxido nítrico (NO), produzido em decorrência da atividade da iNOS, também pode inibir a proliferação de linfócitos e induzir a apoptose (Boche, Perry, & Nicoll, 2013; Gordon & Martinez, 2010; Hume, 2015; Nabeshima et al., 1999).

As micróglias são os macrófagos residentes no SNC e são ontogenicamente distintos das outras células fagocíticas no sistema fagocitário mononuclear, tais como células dendríticas e monócitos. A micróglia origina-se de macrófagos primitivos derivados de precursores eritromo-mielóides no saco vitelino. Estas células rastreiam ativamente os seus domínios circundantes e podem responder rapidamente a mudanças ambientais, como uma ameaça imune. Como consequência, sofrem alterações morfológicas para assumir uma forma amebóide e se tornam fagocíticas para remover a ameaça encontrada (Figura 1). Essas alterações morfológicas também são acompanhadas pela expressão e secreção de moléculas inflamatórias, como citocinas e quimiocinas, que ajudam a micróglia a se comunicar com astrócitos e células imunes periféricas (Aboud, Mrak, Boop, & Griffin, 2014; Greter, Lelios, & Croxford, 2015).

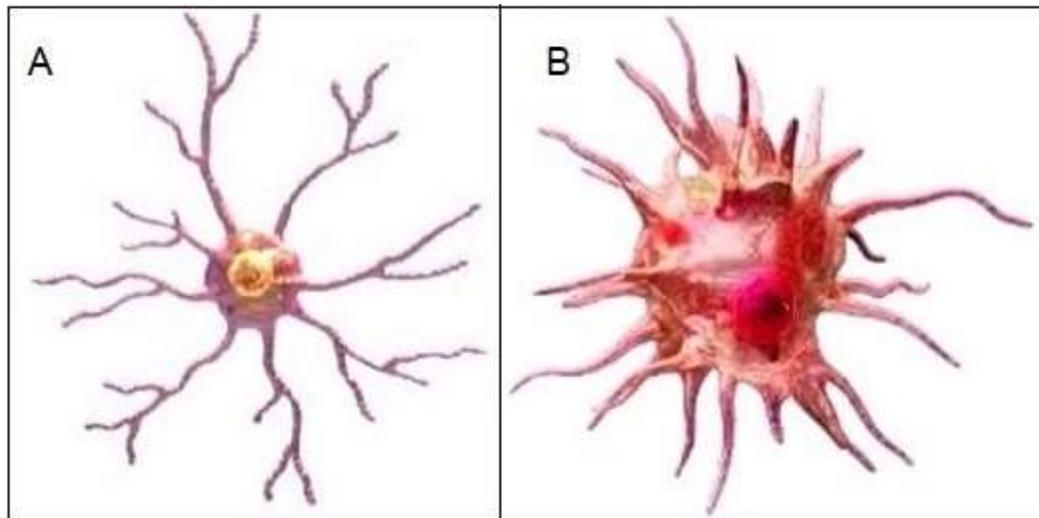


Figura 1. Desenho ilustrativo de micróglia em diferentes estados de ativação. A: Desenho ilustrativo de uma micróglia em estado estacionário. B: Desenho ilustrativo de uma micróglia em estado ativado. Fonte: <https://www.biologend.com/microglia>.

Assim como fagócitos, a microglia ativada prolifera e se acumula em áreas que apresentam alta densidade de neurônios apoptóticos para facilitar o *turnover* neuronal durante a morte celular no desenvolvimento. Além da liberação de células mortas, a fagocitose microglial controla o número de precursores neurais em regiões proliferativas do telencéfalo em desenvolvimento em ratos perinatais. Já as micróglia distróficas, presentes no cérebro de pessoas idosas ou com alguma patologia, apresentam alteração ou degeneração morfológica de senescência assim como ativação e processos citoplasmáticos fragmentados. Portanto, a micróglia possui potencial neurotóxico e neuroprotetor dentro do contexto de patologias do SNC e os papéis microgliais podem ser distinguidos através de dois aspectos: 1) a intensidade inicial das crises agudas; 2) a neurodegeneração tardia que ocorre (Eyo, Murugan, & Wu, 2017; Streit, Braak, Xue, & Bechmann, 2009; Tay, Savage, Hui, Bisht, & Tremblay, 2017).

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares e hidrossolúveis. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinas ativadas por mitógenos (substâncias que induzem mitose em linfócitos ao ligar-se a glicoproteínas da membrana destas células). São

armazenadas como moléculas pré-formadas e atuam, preferencialmente, por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras). Apresentam ações semelhantes que podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. A pleiotropia é uma dessas ações, no qual vários tipos de células podem secretar a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em inúmeros tipos de células. Normalmente, é formada em cascata, uma citocina ativa sua célula-alvo a produzir mais citocinas, ligando-se a receptores específicos e ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica (de Oliveira, Sakata, Issy, Gerola, & Salomão, 2011).

Citocinas e quimiocinas são secretadas por astrócitos e micróglia durante o desenvolvimento fetal humano, sugerindo um papel para as quimiocinas na modulação do sistema nervoso. Os receptores de citocinas estão presentes em populações de neurônios e células gliais em regiões distintas do cérebro. Elas também estão envolvidas em uma sinalização bidirecional entre o sistema nervoso central e o sistema imunológico periférico, desempenhando um papel nos processos cognitivos (Arisi, 2014; Curfs, Meis, & Hoogkamp-Korstanje, 1997; de Oliveira et al., 2011; Zhang & An, 2007).

Embora as citocinas tenham sido classificadas em grupos distintos, tornou-se difícil de ser mantida, uma vez que a maioria das citocinas pode ser produzida por diversos tipos de células, dependendo do agente estimulante e da interação com outras células, tais como: linfocina (citocinas produzidas por linfócitos), monocina (citocinas produzidas por monócitos), quimiocina (citocinas com atividades quimiotáticas) e interleucina (citocinas produzidas por um leucócito e que atuam em outros leucócitos) (Arisi, 2014; Curfs et al., 1997; de Oliveira et al., 2011).

As citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias – Th1) ou atenuar (anti-inflamatórias – Th2) a resposta

inflamatória mediante condições patológicas. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e TNF (fator de necrose tumoral); as anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13. Todos são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, no entanto, a produção exagerada de Th1 a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente de maneira deletéria, ou seja, após lesões ou infecções grave. Essa resposta exacerbada e persistente pode contribuir para lesões em órgão-alvo, podendo levar até a morte. Já as Th2 podem minimizar alguns desses efeitos, como demonstrado na Figura 2 (Arisi, 2014; de Oliveira et al., 2011).

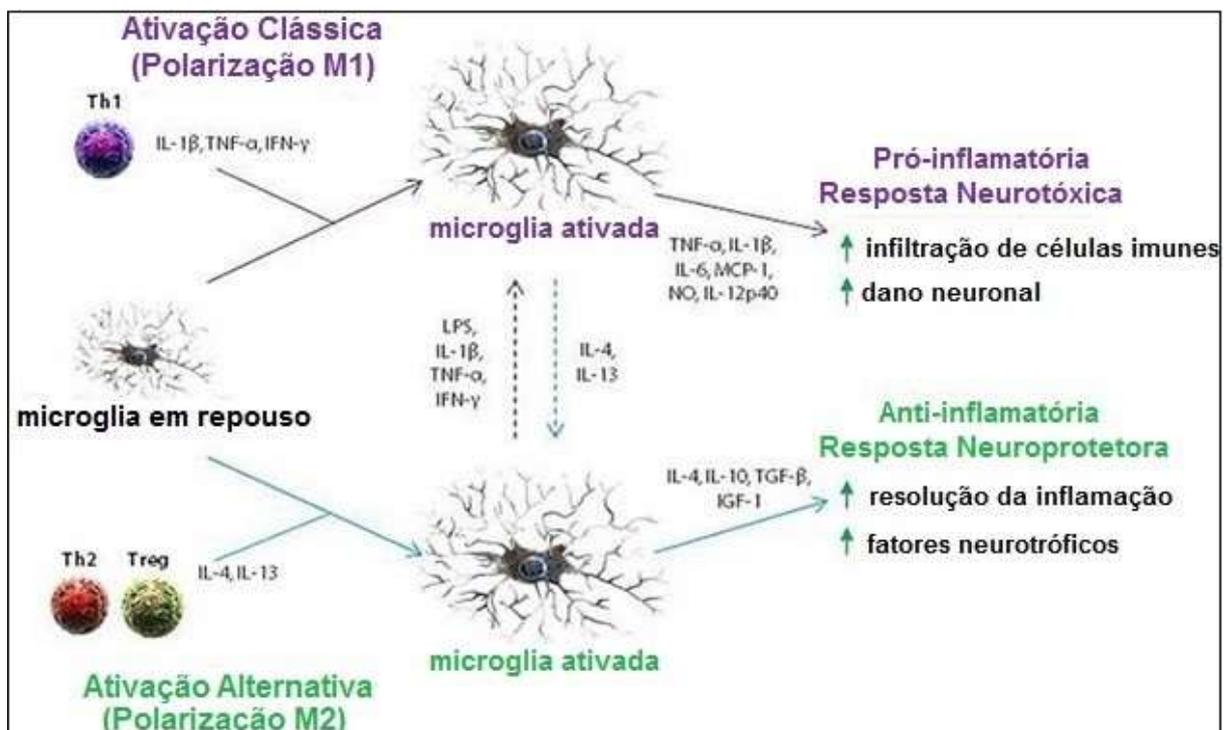


Figura 2. Subpopulações de micróglia - estado M1 (pró-inflamatório) ou M2 (anti-inflamatório), dependendo da natureza do estímulo. No estado M1, a micróglia responde a lesão ou infecção produzindo metabólitos oxidativos, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas para induzir a infiltração de leucócitos periféricos que irão combater e eliminar o insulto ou lesão. No estado M2, a micróglia antagoniza as respostas da subpopulação M1 ao secretar citocinas anti-inflamatórias para facilitar a fagocitose dos restos celulares, promover a reconstrução da matriz extracelular (ECM) e o reparo tecidual. A micróglia M2 também produz fatores neurotróficos que contribuem para a sobrevivência das células neuronais. Fonte: <https://www.biolegend.com/NewsLegend/041216microgliablast/index.htm>

As citocinas participam da regulação da neurogênese, a proliferação de novos neurônios, crucial para as funções do hipocampo, como o aprendizado e a memória. Os neurotransmissores e as citocinas afetam suas células-alvo por meio de receptores de

superfície e também por outros mecanismos moleculares. A sinalização através da secreção de pequenas moléculas é uma característica dos sistemas nervoso e imunológico (Borsini, Zunszain, Thuret, & Pariante, 2015; Eichenbaum, 2017).

O hipocampo é uma estrutura com alta plasticidade, que faz parte do sistema nervoso central (SNC), localizado no lobo temporal de cada hemisfério cerebral e está relacionado com a aprendizagem e memória. A formação hipocampal compreende quatro regiões corticais: o giro dentado, o hipocampo propriamente dito, o complexo subicular e o córtex entorrinal. O giro dentado é dividido em três camadas: camada molecular, camada de células granulares e camada polimórfica (hilo). Já o hipocampo propriamente dito é dividido em três subcampos, chamados CA (*cornu de Amón*): CA3, CA2 e CA1.

Assim, os circuitos anatômicos da formação hipocampal incluem a clássica via tri-sináptica: o giro dentado recebe sua maior aferência do córtex entorrinal (via perfurante); as células granulares projetam através das fibras musgosas para a região hilar e para a região de CA3. Das células piramidais de CA1 emergem axônios colaterais que terminam em neurônios de CA3 via conexões de associação e também proporcionam a maior aferência para os neurônios piramidais de CA1 (via colateral de Schaffer) (Eichenbaum, 2017; Scorza et al., 2005).

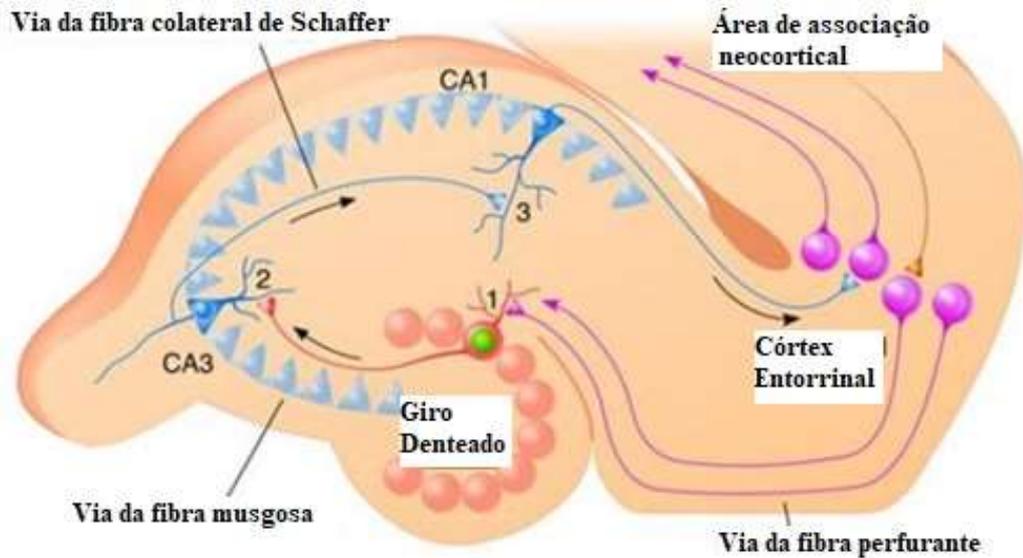


Figura 3. Esquema do hipocampo e giro denteado. Circuito tri-sináptico simplificado do hipocampo. Visualizam-se os cornos de Amón: CA1, CA2, CA3, GD. O giro denteado recebe as projeções do córtex entorrinal através da via perfurante (1º sinapse) e projeta através dos axônios das células granulares para CA3 (2º sinapse). Este último projeta para CA1 (3º sinapse) através dos axônios das células piramidais. Fonte: www.uni-leipzig.de/.../graphic_hippo_farbig.html.

O hipocampo, como já mencionado antes, é um local relacionado com a consolidação de memória inserido no processo de aprendizagem e envolvido na aquisição de novos repertórios por parte dos organismos em processos que envolvem a captação, identificação e a classificação de diferentes estímulos visuais, auditivos, olfativos, entre outros. Esses estímulos são importantes fontes de informações ao organismo e responder a esses eventos tem valor adaptativo. Os processos de estabelecimento de controle desses eventos sobre as respostas do organismo seriam relevantes para aqueles que estudam a aprendizagem e a memória e possíveis déficits produzidos por fatores diversos, como a epilepsia (Motta-Teixeira, Takada, Machado-Nils, Nogueira, & Xavier, 2016; Mourão Júnior & Faria, 2015).

De acordo com Von Ehrenstein et al. (2012), estudos com modelos experimentais mostraram que várias citocinas estão envolvidas na neurogênese, na maturação sináptica, na geração de redes neuronais e outros processos importantes do desenvolvimento cerebral, podendo também afetar direta ou indiretamente a cognição. Nesse sentido, tanto a superexpressão como a deficiência de determinadas citocinas pode influenciar positiva e

negativamente a memória relacionada ao hipocampo e a plasticidade sináptica sob condições patológicas e fisiológicas (Von Ehrenstein et al., 2012).

Estes estudos sugerem ainda que os comprometimentos da memória e de outras funções cognitivas, como atenção, linguagem, entre outros, são comuns em pacientes com epilepsia. As causas dessas deficiências têm sido atribuídas à perda de células do hipocampo neuronal, à disfunção dos neurônios hipocampais sobreviventes, bem como aos efeitos adversos dos medicamentos antiepiléticos. Os déficits cognitivos, as alterações comportamentais, inclusive de respostas do sistema nervoso autonômico são comorbidades muito comuns da epilepsia (Arend et al., 2018; Berilgen, Sari, Bulut, & Mungen, 2004; Vezzani, Aronica, Mazarati, & Pittman, 2013).

Os déficits cognitivos, definidos como alterações nos domínios das funções executivas, processamento de atenção, informação e memória, são observados em cerca de 70% a 80% dos pacientes com epilepsia. A doença está fortemente associada a uma série de comorbidades mentais e somáticas, causando interferências na escala social como, por exemplo, a restrita oportunidade de emprego, de assistência social e de constituir família. Além disso, é possível que os pacientes portadores de epilepsia sofram marginalização e estigmatização social. Estas pessoas enfrentam o risco de crises imprevisíveis e, muitas vezes, socialmente constrangedoras, tornando as crises uma ameaça permanente ao dia a dia (Elger, Johnston, & Hoppe, 2017; Helmstaedter & Witt, 2017; Trivedi, 2006).

Como já mencionado anteriormente, a ELT é a forma mais comum de epilepsia em humanos adultos, em que o foco epilético é frequentemente encontrado na formação do hipocampo. Após a primeira crise, ocorre um período denominado epileptogênese, no qual ocorrem várias alterações do circuito celular e neuronal, acompanhadas por perda neuronal, anormalidades de conectividade e gliose. Essa relação entre inflamação e epilepsia tem sido documentada tanto em modelos animais com ELT quanto em humanos. Porém, até o presente

momento, não foram encontrados estudos que demonstrem a expressão de citocinas inflamatórias e seu papel a longo prazo em hipocampos de pacientes portadores de epilepsia submetidos à hipocampectomia unilateral (Vezzani & Rüegg, 2011; Vinet et al., 2016).

A micróglia ativada tem sido observada logo após o *status epilepticus* em ratos, bem como vários dias depois, e tem sido correlacionada com a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, onde IL-1 β e o TNF α podem ser responsáveis por aumentar a excitabilidade neuronal, portanto, podem estar envolvidos no desenvolvimento da atividade epiléptica. Tais dados fornecem evidências de que a micróglia pode desempenhar um papel proeminente no desenvolvimento da doença. A microglia possui potencial neurotóxico e neuroprotetor no contexto das doenças do SNC. A reatividade da microglia durante as crises convulsivas ocorre antes da manifestação da neurodegeneração (Vezzani et al., 2013; Vinet et al., 2016; Wu et al., 2018; Zheng et al., 2009).

Portanto, é necessário e emergencial analisar os fenótipos microgliais no desenvolvimento da epilepsia do lobo temporal em humanos para entender se tais células podem interferir no processo de ativação da epilepsia. Assim, o presente trabalho analisou a expressão de citocinas inflamatórias em hipocampos de pacientes portadores de epilepsia submetidos à hipocampectomia unilateral.

Objetivos

Geral

Analisar a expressão de citocinas inflamatórias em hipocampos de pacientes portadores de epilepsia submetidos à hipocampectomia unilateral.

Específicos

Identificar o padrão de marcação de Anti- Iba- 1 em hipocampos de pacientes portadores de epilepsia submetidos à hipocampectomia unilateral;

Identificar o padrão de marcação de TGF β em hipocampos de pacientes portadores de epilepsia submetidos à hipocampectomia unilateral

Analisar quantitativamente o padrão de expressão das micróglias e células anti-inflamatórias

Analisar quantitativamente o padrão de expressão de micróglias distróficas

Método

Participantes

Foram selecionados cinco pacientes portadores de Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) que foram submetidos ao tratamento cirúrgico e concordaram em doar o material biológico para a análise desta pesquisa. Os critérios de inclusão foram se encontrar na faixa etária entre 18 e 60 anos, não ter diagnóstico de outras patologias neurológicas e apresentar boa preservação tecidual. Os critérios de exclusão foram os tecidos dos pacientes nos quais não havia o hipocampo completo.

Para a proteção da identidade dos pacientes, cada um recebeu um código de identificação (P1, P2, P3, P4, P5) conforme a ordem cronológica das cirurgias realizadas. Dos cinco tecidos colhidos, apenas dois se enquadravam dentro dos critérios de inclusão descritos anteriormente, os pacientes P4 e P5. Todos os pacientes foram avaliados clinicamente antes e depois da cirurgia, porém não realizaram avaliação comportamental neste estudo. Os dados obtidos nesse trabalho referem-se aos mesmos pacientes descritos no trabalho de Gama (2018).

Com relação aos dados gerais, o paciente P4 tinha 46 anos de idade, sexo feminino, auto-declarado de raça parda, solteiro, escolaridade ensino técnico e a ocupação de técnico em radiologia. Já o P5, tinha 26 anos de idade, sexo masculino, auto declarado de raça parda, solteiro, escolaridade ensino médio e declarou que não trabalha. De acordo com Gama (2018), a primeira crise epiléptica do paciente P4 ocorreu na infância, já o paciente P5 relatou a primeira crise na idade adulta. Além disso, os dois pacientes apresentaram pelo menos quatro crises por mês, sendo que o esquema terapêutico de cada um não foi homogêneo, apresentando um uso de altas dosagens e interações medicamentosas, como demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes P4 e P5. (Adaptado de Gama, 2018). NC = Não coletado.

História Clínica	P4	P5
Evento precipitante	NC*	1 ano Crise febril seguida de desmaio por 4 horas
Período de latência (entre o evento precipitante e a primeira crise)	NC*	21 anos
Idade da primeira crise	Antes dos 5 anos	22 anos
Frequência de crise antes da cirurgia	10/ mês	2-3/semana
Esquema terapêutico na ocasião da cirurgia	Oxcarbazepina 1200mg	Cabamazepina 400 mg Valproato 1000 mg Clobazam 10 mg/dia

Procedimento

Os participantes selecionados foram atendidos em diferentes lugares da região metropolitana de Belém, tanto em ambulatórios da iniciativa pública (Hospital Universitário João de Barros Barreto e Hospital Ophir Loyola), quanto da rede privada. A abordagem dos participantes foi realizada antes da consulta, informando sobre os objetivos do projeto. Os pacientes selecionados assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (ANEXO A).

Todos os procedimentos seguiram as diretrizes éticas internacionais (Declaração de Helsinque, Diretrizes Internacionais para as Pesquisas Biomédicas envolvendo Seres Humanos – CIOMS) e Brasileiras (Resolução CNS 196/96 e complementares), desta maneira e de acordo com a Resolução CNS 196/96, a qual ressalta que “toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida a apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa”.

A pesquisa em questão foi submetida por meio da plataforma Brasil ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, o qual se localiza no Núcleo de Medicina Tropical, 1º andar na Av. Generalíssimo Deodoro, 92 – Umarizal. CEP 66.055-240, Belém – PA. O aceite foi favorável e recebido no dia 13/12/2017, com Certificado de Apreciação para Apresentação Ética (CAAE) de numero 67114317.2.0000.5172 e fez parte do projeto de Dissertação de Mestrado de Gama (2018).

Obtenção do tecido e preparo histológico

Imediatamente após a ressecção hipocampal cirúrgica, as amostras de hipocampo foram recolhidas no centro cirúrgico e imersas em solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,1 M, durante três dias. O procedimento foi finalizado nos laboratórios de Neurobiologia da Universidade Federal do Pará e na Seção de Patologia do Instituto Evandro Chagas.

Após a fixação do material, o mesmo foi submetido a crioproteção por imersão em soluções crescentes de sacarose 15%, 20% e 30%, diluídas em Tampão Fosfato 0.1M com acréscimo de glicerina 2%. Em seguida, o material foi cortado no criostato Leica Jung CM300 a 30 µm, em plano coronal ao eixo rostro-caudal da formação do hipocampo.

Coloração de Nissl

O método de Nissl utiliza o cresil violeta, um corante básico que é utilizado para evidenciar o citoplasma de neurônios. O citoplasma contém várias estruturas, inclusive os corpúsculos (ou substância) de Nissl, os quais são compostos, basicamente, por RNA. Deste modo, esta coloração serve como indicador da viabilidade neuronal, pois quando ocorre lesão neuronal, esses corpúsculos podem desaparecer, fenômeno chamado de cromatólise (Scorza et al., 2005). Foi utilizado esse método para avaliar os achados patológicos nos hipocampos

retirados pela hipocampectomia unilateral. A coloração foi realizada conforme o protocolo descrito abaixo.

Foram selecionados os cortes dos tecidos dos pacientes P4 e P5. Esses cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e submetidos a uma bateria de coloração (álcool 100%, 70%, 50%, 20%, Água destilada, solução de tionina 0,1%, xilol). As lâminas foram imersas nas soluções de álcool na sequência de solução com maior concentração para menor concentração (álcool 100%, 70%, 50%, 20%) com tempo de incubação de 1 minuto em cada solução.

Em seguida os cortes foram imersos em água destilada por 1 minuto seguido pela imersão na solução de tionina 0,1% durante 8 segundos. Após a tionina 0,1%, as lâminas foram novamente imersas em água destilada por 45 segundos seguido da imersão sequencial nas soluções de álcool, desta vez, na sequência da solução com menor concentração para maior concentração (Álcool 20%, 50%, 70%, 90% 100%) com tempo de incubação de 45 segundos em cada. As lâminas foram imersas em xilol durante 30 minutos e, na sequência, foi realizada a montagem com Permount (Fisher Scientific) e lamínula, para proteção tecidual.

Processamento Imunohistoquímico

Para o procedimento imunohistoquímico, as secções foram previamente lavadas com /água destilada (5 minutos) + PBS (Solução Tampão Fosfato) por 5 minutos. Após essa etapa, realizou-se a recuperação antigênica com solução de ácido cítrico em banho Maria a 90° C por 20 minutos. Em seguida, as secções foram novamente lavadas com água destilada + PBS por 5 minutos. Em sequência, realizou-se a permeabilização do material com solução de Saponina durante 10 minutos. Foi efetuada uma terceira bateria de lavagem com PBS (2 vezes) durante 5 minutos cada. Posteriormente, foi realizado o bloqueio das proteínas inespecíficas com BSA (Bovine Serum Albumin) 10% por 30 minutos e a incubação com os respectivos anticorpos primários (Tabela 1) por toda a noite (*overnight*).

No dia seguinte, realizou-se duas lavagens em PBS por 5 minutos cada para remoção do excesso de anticorpo primário. Em seguida, as amostras foram incubadas em um ligante biotilado contendo IgG anti-camundongo e anti-coelho (fabricante Dako REF K0675) por 30 minutos a 37° C. Foram efetuadas outras duas lavagens em PBS por 5 minutos e a incubação em Streptavidina conjugada a peroxidase de rábano (HRP) por 30 minutos a 37 °C (fabricante Dako REF K0675). Este método (LSAB-Labelled Streptavidin Biotin) consiste em usar a biotina que se liga ao anticorpo primário e em seguida, a Streptavidina conjugada a enzima que se liga a biotina, a qual é revelada com DAB (Diaminobenzidine), como descrito abaixo.

Na etapa final, foram efetuadas mais duas lavagens em PBS com 5 minutos cada, seguida pela revelação com a solução de DAB (Diaminobenzidine), na qual o tempo de revelação variou entre 30 segundos e 2 minutos. A reação foi interrompida com a lavagem das amostras em PBS. Algumas secções foram contracoradas com Hematoxilina (1 min) para melhor visualização da formação hipocampal. A montagem final das laminas foi precedida de desidratação e diafanização do material usando a seguinte bateria: álcool 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, xilol 1 e xilol 2 (2 minutos em cada solução). Após essa fase, realizou-se a montagem com Permunt (Fisher Scientific) e lamínulas para proteção tecidual. Todos os passos apresentados nessa seção seguiram o protocolo padrão do laboratório de Imunohistoquímica da Seção de Patologia (SAPAT) do Instituto Evandro Chagas (IEC). Os anticorpos utilizados e sua marcação específica se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Fabricante, diluição utilizada e marcação específica de cada anticorpo primário.

Anticorpo	Fabricante	Diluição de uso	Marcação
Anticorpo policlonal anti-Iba 1 feito em coelho	WAKO 019-19741	1:1000	Micróglia e macrófagos
Anticorpo monoclonal anti-TGF β feito em camundongo	Abcam (ab190503)	1:100	Marcador anti-inflamatório para proliferação e diferenciação celular

Análise de dados

Análise morfológica do hipocampo

Análise qualitativa

A análise e documentação fotográfica das lâminas foi realizada em um microscópio óptico e binocular (Carl Zeiss, modelo Imager.Z1) acoplado ao sistema de captura de imagem AxioCam Hrc e Axio Vision. As fotomicrografias foram analisadas qualitativa e quantitativamente em comparação aos dados descritos na literatura acerca da ELT.

Análise quantitativa

A análise microscópica foi feita em um microscópio binocular OLYMPUS BX41. As células marcadas positivas para anti-Iba-1 e anti-TGF β dos pacientes P4 e P5 foram contadas com auxílio de uma objetiva de 40X com retículo de contagem de área 0.0625mm² acoplado a ocular deste microscópio.

Para a contagem foram utilizadas duas secções de cada paciente. O retículo de contagem de área total de 0,0625mm² dividido em 100 campos iguais foi posicionado na área escolhida para a contagem. A contagem foi realizada em três campos da secção para cada área de CA1, CA3 e Giro Denteado, sendo um total de seis campos por área de cada paciente.

Análise Estatística

O GraphPad Prism Versão 7.0 (La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas. Foi utilizado o Teste de Shapiro – Wilk para verificar a normalidade das amostras. Dependendo da distribuição desses dados, testes estatísticos paramétricos ou não paramétricos foram aplicados. Para comparações dos dois pacientes, o teste t de Student ou o teste U de Mann-Whitney foram utilizados. O nível de significância adotado foi $p < 0.05$ e os resultados foram expressos em gráficos com média (\pm erro padrão).

Resultados

Foi utilizado, como descrito nos materiais e métodos, o hipocampo de dois pacientes, P4 e P5, os quais foram submetidos a cirurgia de hipocampectomia unilateral para tratamento da epilepsia do lobo temporal. Os tecidos utilizados apresentaram boa fixação e preservação tecidual satisfatória. Foi realizada a imunohistoquímica de anti-Iba-1, para a marcação de células microgliais e macrófagos; e o TGF β , uma proteína que apresenta um fator anti-proliferativo e que controla diferenciação celular, desempenhando um papel anti-inflamatório na imunidade.

Achados patológicos

Os achados patológicos foram analisados nos tecidos dos pacientes P4 e P5 e foi encontrado gliose hipocampal em ambos os tecidos (Figura 4). Comparando-se as áreas A (paciente P4) e B (paciente P5) observa-se maior expressão de gliose hipocampal em P5. Os dados da Tabela 1 indicam que este paciente não apresentou uma história de vida tão duradoura com a doença, pois o início das crises foram na idade adulta, apesar de apresentar maior intensidade de crise e interação medicamentosa, o que pode justificar este resultado.

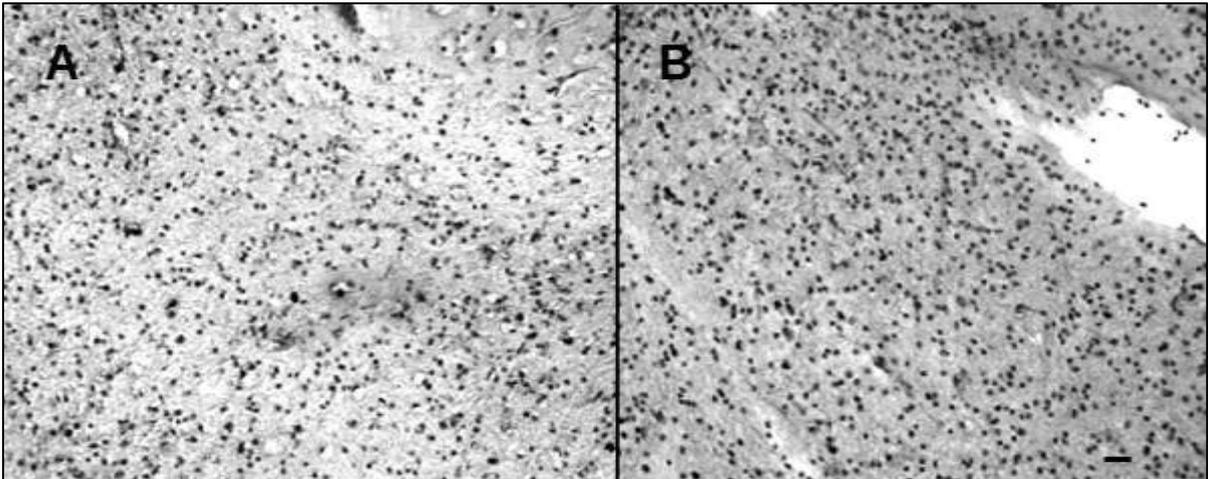


Figura 4. Fotomicrografias da área hipocampal dos tecidos de P4 e P5 com marcação de Nissl para visualização de gliose hipocampal. A área 4A corresponde ao tecido e gliose hipocampal do paciente P4 e a área B, ao tecido e gliose hipocampal do paciente P5. Escala = 20 μ m

A esclerose hipocampal foi observada apenas no paciente P5, conforme demonstrado na Figura 5, em menor e médio aumento. Observa-se nesta figura, a alteração do formato e estrutura do hipocampo, bem como a dispersão das células granulares. É possível verificar, também, a perda neuronal e gliose, principalmente das células da região hilar (h).

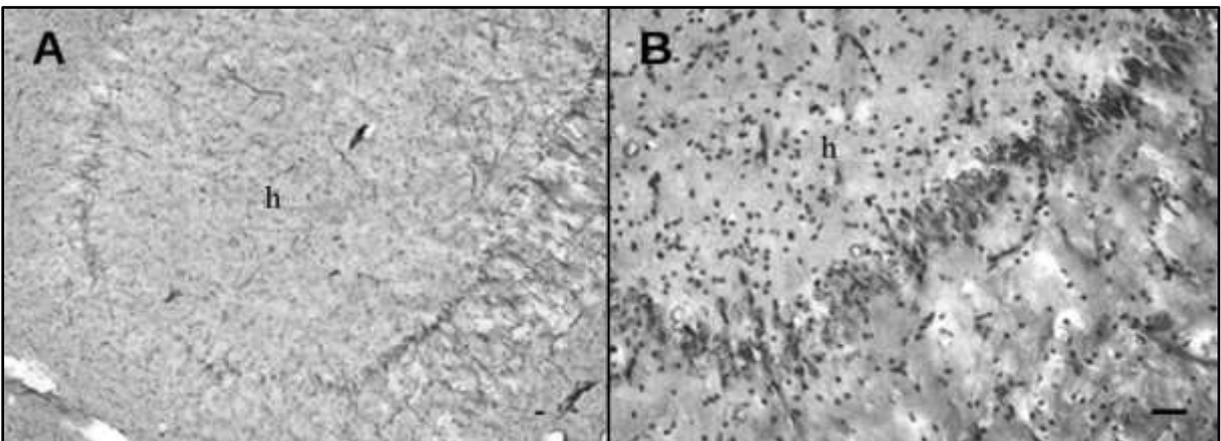


Figura 5. Fotomicrografias da área hipocampal dos tecidos de P5 com marcação de Nissl para visualização de esclerose hipocampal. Escala= 5 μ m (Figura 5A) e 20 μ m (Figura 5B).

Padrão de imunoreatividade de anti-Iba-1 e anti-TGF β em hipocampos de pacientes com ELT

A Figura 6, em médio aumento, ilustra a marcação obtida com anticorpo anti-Iba-1, para evidenciar macrófagos e microglia no Sistema Nervoso Central. A seta preta na área A ilustra o aglomerado celular de microglia em processo degenerativo (microglia distróficas)

encontrado no hipocampo do paciente P4 com Epilepsia do Lobo Temporal. Na área B da figura, referente ao paciente P5, foi encontrado o mesmo padrão de marcação, porém, com pouca imunoreatividade e menor aglomerado.

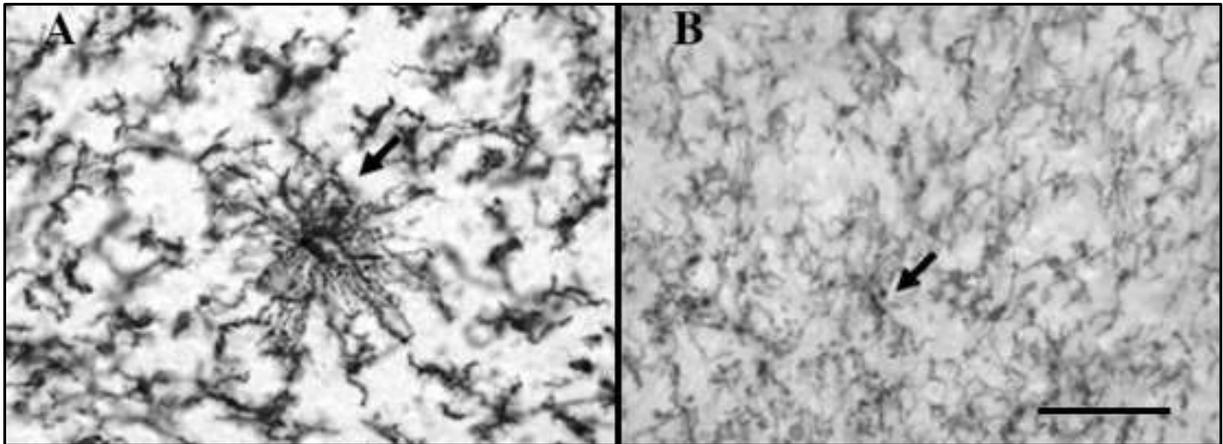


Figura 6. Fotomicrografias da área hipocampal dos tecidos de P4 e P5 com marcação de anti-Iba-1 para visualização de micróglia distrófica. A área A é referente ao paciente P4 e a área B, ao paciente P5. Escala = 40 μ m.

A Figura 7 ilustra, em baixo (áreas A e B) e médio aumento (áreas C e D), ilustra a marcação obtida com anticorpo anti-TGF β , para evidenciar citocinas anti-inflamatórias presentes no hipocampo de pacientes que foram submetidos a hipocampectomia unilateral. Pode-se observar uma maior reatividade do anti-TGF β na imagem C, quando comparada a imagem D.

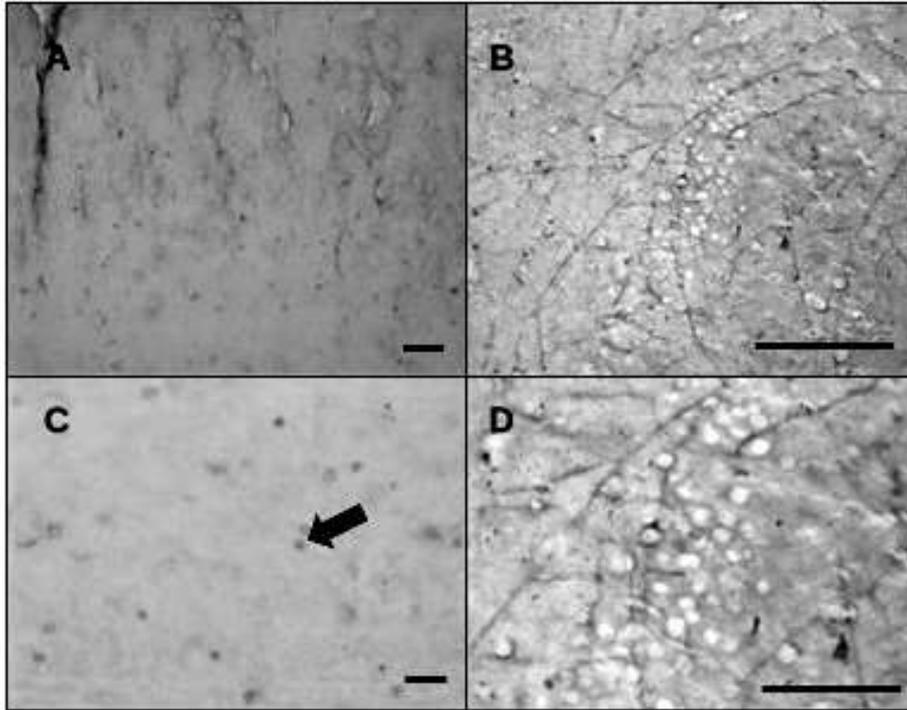


Figura 7. Fotomicrografias da área hipocampal dos tecidos de P4 e P5 com marcação de anti-TGF β para visualização de citocinas anti-inflamatórias. As áreas A e C correspondem ao paciente P4 e as áreas B e D ao paciente P5. A seta preta na área C representa a marcação positiva de TGF β . Escala: A e C = 20 μ m e B e D = 40 μ m.

Análise quantitativa do padrão de imunoreatividade para Anti-Iba-1 em diferentes regiões hipocampais

A Figura 8 ilustra os resultados encontrados na análise quantitativa feita nos tecidos estudados. As figuras abaixo representam o número de células anti-Iba-1 positivo/mm², ou seja, a quantidade de micróglias nas áreas analisadas. É possível identificar que nas áreas de CA1, CA3 e Giro denteado houve diferença significativa entre o paciente P4 e P5.

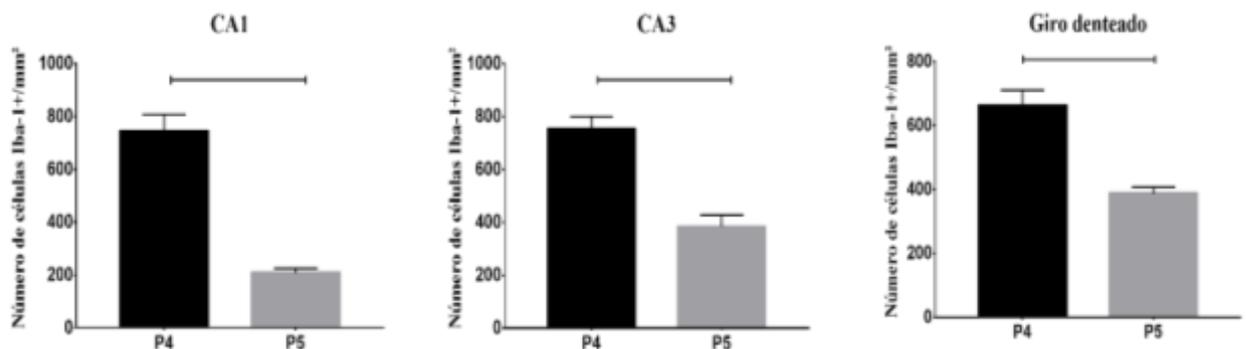


Figura 8. Número de células de anti-Iba-1 positivo / mm² para os pacientes P4 e P5 em cada área do hipocampo (CA1, CA3 e Giro denteado). Foram realizadas análises estatísticas para cada área do hipocampo.

Observa-se, também, que a quantidade de células contabilizadas em CA1 apresentou uma diferença extremamente significativa, seguida daquelas nas áreas de CA3 e Giro denteado, como demonstrado na tabela 3. Além disso, o quantitativo de células do paciente P4 foi maior que os achados no paciente P5.

Tabela 3. Número de células / mm² e valor de *p* para as marcações de anti-Iba1 nas três regiões hipocâmpais dos pacientes P4 e P5.

Regiões Hipocâmpais	Média das células		p-valor
	P4	P5	
CA1	744	208	<0,0001****
CA3	752	384	0,0002****
Giro Denteado	661,3	386,7	0,0004****

****Teste T não pareado.

A Figura 9 representa graficamente o número de micróglia distrófica através da marcação de anti-Iba-1 positivo/mm², ou seja, a quantidade de micróglia distrófica em cada área analisada do hipocampo de cada paciente. Observa-se que houve maior diferença em relação à quantidade de células nas áreas CA1 e CA3 entre o paciente P4 para o P5, com P4 apresentando maior quantidade de células.

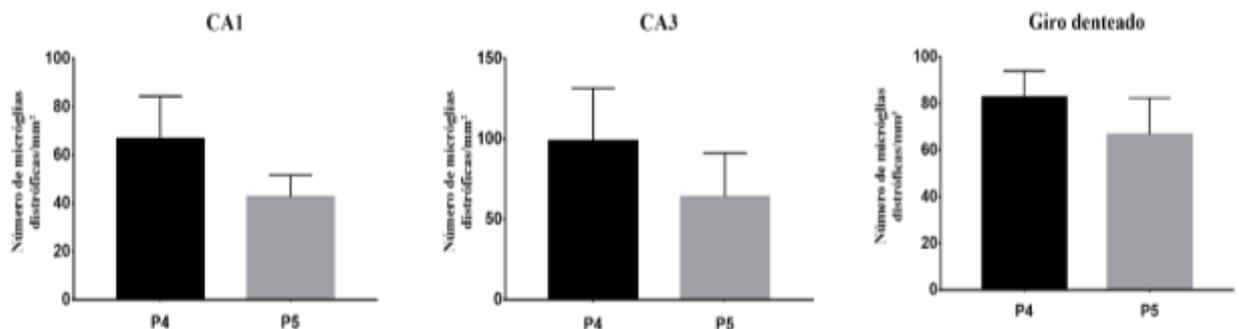


Figura 9. Número de micróglia distrófica / mm² para os pacientes P4 e P5 em cada área do hipocampo (CA1, CA3 e Giro denteado). Foram realizadas análises estatísticas para cada área do hipocampo.

P4 apresentou maior quantidade de células distróficas em todas as três áreas do hipocampo analisado. No entanto, não houve diferença estatística em nenhuma região, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Número de células / mm² e valor de *p* para as marcações de anti-Iba1 para micrógilas distróficas nas três regiões hipocampais dos pacientes P4 e P5.

Regiões Hipocampais	Média das células		p-valor
	P4	P5	
CA1	66,67	42,67	0,25
CA3	98,67	64	0,43
Giro Denteado	82,67	66,67	0,42

Teste T não pareado

Análise quantitativa do padrão de imunoreatividade para anti-TGF β em diferentes regiões hipocampais

A figura 10 representa a quantidade de células TGF β positivas / mm² dos tecidos de P4 e P5. É possível observar P4 apresentou mais células imunorreativas nas áreas de CA3 e Giro denteado quando comparado ao paciente P5 e que P5 apresentou mais células imunorreativas na área de CA1 do que P4.

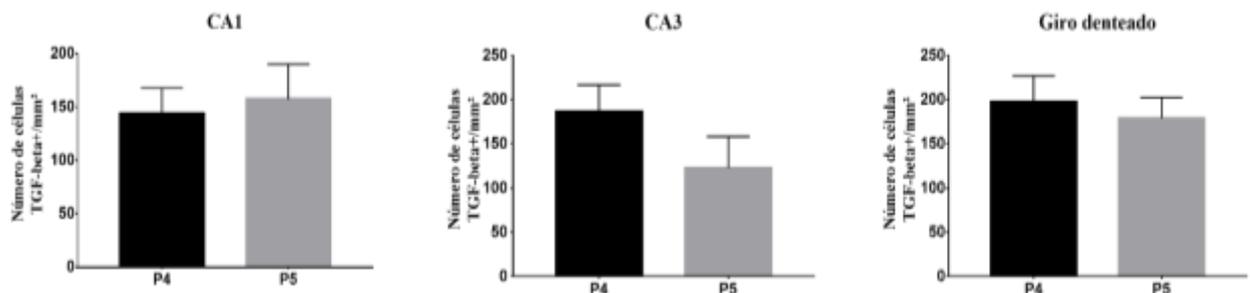


Figura 10. Número de células TGF β positivas / mm² para cada área do hipocampo (CA1, CA3 e Giro denteado). Foram realizadas análises estatísticas para cada área do hipocampo.

A Tabela 5 demonstra o número de áreas contadas de cada paciente e a média de células por área. Nota-se que, apesar das diferenças do número de células entre as áreas de contagem do paciente P4 para o P5, não houve diferença significativa na análise estatística, dado representado pelo p-valor.

Tabela 5. Número de células anti-TGF β / mm² e valor de *p* nas três regiões hipocâmpais dos pacientes P4 e P5.

Regiões Hipocâmpais	Média das células		p-valor
	P4	P5	
CA1*	144	157,3	0,60
CA3**	186,7	122,7	0,19
Giro Denteado**	197,3	178,7	0,63

*Teste de Mann-Whitney; **Teste T não pareado.

A Figura 11 representa a população total de células positivas de anti-Iba-1 e anti-TGF β dos pacientes P4 e P5, ou seja, a quantidade total de células presentes no hipocampo desses tecidos, sem que tenha sido feita a diferenciação por áreas hipocâmpais. Observa-se que a população total do hipocampo de P4 é significativamente maior que a de P5. Contudo, apesar de haver uma diferença entre P4 e P5 para o TGF β , onde há mais células imunorreativas em P4 do que P5, não há significância estatística nesta diferença.

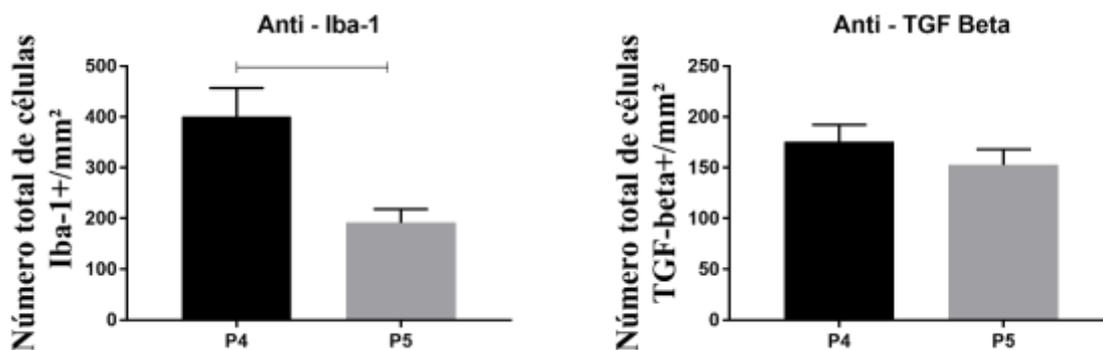


Figura 11. População total de células positivas de anti-Iba-1 e anti-TGF β nos tecidos dos pacientes P4 e P5. Foram analisadas todas as áreas do hipocampo de P4 e P5. Para o anti-iba-1 foi utilizado o Teste de Mann-Whitney, com p-valor= 0,01; já para o anti-TGF β , o Teste T não pareado, com p-valor= 0,3.

A Figura 12 representa a população total de micróglia e a porcentagem para cada área do hipocampo, CA1/CA3/Giro denteado, dos pacientes P4 e P5. É possível verificar que o paciente P4 apresentou maior quantidade de micróglia do que o P5. Porém, quando é analisado a quantidade de micróglia / área, as áreas de CA3 e do Giro denteado do paciente P5 apresentaram mais micróglia do que as do paciente P4.

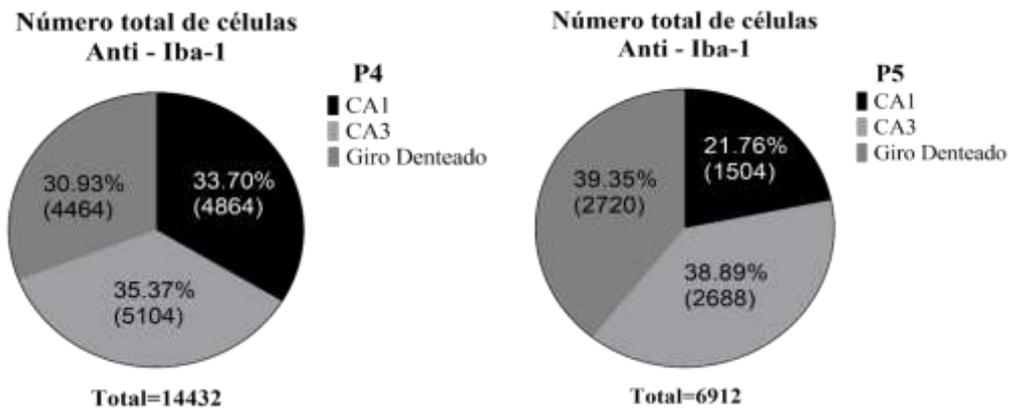


Figura 12. Representação em pizza com a população total de anti- Iba-1 e a porcentagem para cada área do hipocampo. Cada área do hipocampo é representada com sua respectiva porcentagem e número total de células da área, bem como o número de células total do hipocampo.

A Figura 13 representa a população total de células anti-inflamatórias e a porcentagem para cada área do hipocampo, CA1/CA3/Giro denteado, dos pacientes P4 e P5. Observa-se que o paciente P4 apresentou maior quantidade de células anti-inflamatórias do que o P5. Porém, quando foi analisada a quantidade de células / área, as áreas de CA1 e do Giro denteado do paciente P5 apresentaram mais células anti-inflamatórias do que as do paciente P4.

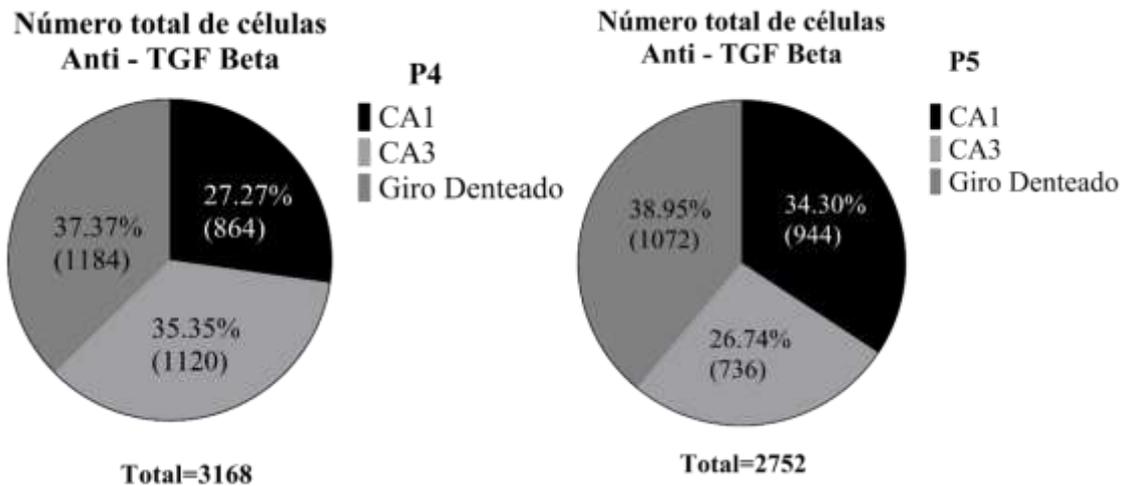


Figura 13. Representação em pizza com a população total de anti-TGF β e a porcentagem para cada área do hipocampo. Cada área do hipocampo é representada com sua respectiva porcentagem e número total de células da área, bem como o número de células total do hipocampo.

Discussão

Aspectos patológicos evidenciados pela coloração de Nissl

A epileptogênese é o processo pelo qual um cérebro normal torna-se propenso a desenvolver crises recorrentes espontâneas. Normalmente desenvolve-se após danos cerebrais ou alterações patológicas, como a epilepsia. Há cada vez mais evidências que sugerem que as micróglia podem desempenhar um papel nesse processo. As micróglia são as principais células imunes inatas no SNC e o principal produtor de citocinas pró-inflamatórias em resposta à lesão cerebral. A inflamação está envolvida no processo de epileptogênese e múltiplas citocinas pró-inflamatórias são geradas em grande quantidade pela microglia após o *status epilepticus* (Wu et al., 2018; Yacubian & Kochen, 2014; Zhao et al., 2018). Neste estudo foram analisados os fenótipos microgliais no desenvolvimento da epilepsia do lobo temporal em humanos submetidos à hipocampectomia para verificar se tais células podem interferir no processo de neuroinflamação na epilepsia (ver métodos na página 25).

Conforme demonstrado nas Figuras 4 e 5, é possível verificar que P5 apresentou maior expressão de gliose hipocampal (Figura 4, área B), além de esclerose hipocampal e perda neuronal (Figura 5, áreas A e B), principalmente das células da região hilar. É importante

destacar que embora esse paciente não tenha vivido muito tempo com a doença, pois a primeira crise surgiu na idade adulta, ele apresentava maior intensidade de crise e interação medicamentosa. Esse dado sugere que pode haver uma diferença no padrão de expressão de citocinas baseada no tempo em que o organismo convive com a crise e nas suas possíveis interações medicamentosas pelo uso contínuo do fármaco. O paciente P4 apresentou maior quantidade de células microgлияis com marcação de anti-Iba1 e maior ativação de citocinas anti-inflamatórias (TGF β), representando as células do tipo M2. Do mesmo modo, esse dado sugere uma correlação de citocinas anti-inflamatórias com anti-Iba1. Porém, são necessários experimentos adicionais de dupla marcação para confirmar esta hipótese.

O estudo de Henshall e Engel (2013) demonstrou que a epileptogênese está associada à morte neuronal aguda e tardia, gliose (principalmente astrócitos e microglia), neuroinflamação, neurogênese aberrante e remodelamento da matriz extracelular. Em conformidade com as descobertas desses autores, neste estudo observou-se alterações de neuroinflamação e gliose, com redução de número de células na área hipocampal analisada, como demonstradas na Tabela 3 e na Figura 8.

Aspectos gerais da marcação imunohistoquímica

A epilepsia do lobo temporal e as suas características patológicas incluem reações inflamatórias, dano neuronal e perda neuronal no hipocampo. Muitas linhas de evidências sugerem que a inflamação cerebral pode ser considerada uma consequência, bem como uma causa de epilepsia e convulsões. A marcação por imunohistoquímica é uma das metodologias usadas para facilitar a análise de proliferação celular utilizando a ligação específica de anticorpos a proteínas expressas durante os estágios do processo proliferativo (Leal et al., 2017; Toni & Schinder, 2016; Wu et al., 2018).

O status epilepticus (SE) induz respostas microgлияis rapidamente no hipocampo e causa a liberação de múltiplas citocinas pró-inflamatórias. A microglia possui potencial

neurotóxico e neuroprotetor no contexto das doenças do SNC. A reatividade da microglia durante as crises convulsivas ocorre antes da manifestação da neurodegeneração. Estudos recentes descobriram que a microglia também desempenha um papel importante na neurogênese aberrante induzida pela epilepsia (Frigerio et al., 2018; Wu et al., 2018). Tal estudo corrobora os achados no presente estudo, apresentados na Figura 6 que demonstra o aglomerado celular de microglias em processo degenerativo (micróglias distróficas) encontrado no hipocampo dos pacientes P4 e P5.

A ação pró-inflamatória da micróglia é descrita como a origem que conduz a epileptogênese. Foram encontradas micróglias morfológicamente reativas nos cérebros de modelos animais de epilepsia do lobo temporal (ELT) e em ressecções cirúrgicas de pacientes com epilepsia (Ravizza et al., 2005; Vezzani, 2014). No presente estudo, realizado em tecido humano, também foram encontrados o mesmo padrão de micróglias reativas, representado pela Figura 8. Esse resultado, além de inédito e nunca descrito em detalhes na literatura, demonstra uma potencial fonte de investigação para a origem da epileptogênese.

Na ausência de patologia, a microglia envelhecida tem maior expressão de genes pró-inflamatórios e marcadores apresentadores de antígenos, como sinalização de inflamassomas (moléculas necessárias para ativar uma enzima chamada caspase-1); aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias; enquanto citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10 e TGF β 1, e fatores inibitórios da ativação microglial, como CD200, são regulados para baixo. Estes parâmetros indicam que, à medida que os humanos e os roedores envelhecem, a microglia assume um fenótipo consistente com uma resposta pró-inflamatória (Tay et al., 2017).

Os Resultados descritos na Figura 7 ilustram a marcação obtida com anticorpo anti-TGF β , marcador anti-inflamatório, o qual foi mais imunorreativo ao paciente P4. Essa maior reatividade pode estar relacionada à presença da epilepsia do lobo temporal e ao tempo de

exposição às crises convulsivas, que se iniciaram antes dos 5 anos de idade, com uma frequência média de 10 crises por semana.

Um estudo realizado com pacientes com Doença de Alzheimer encontrou um padrão de estruturas neuronais degeneradas positivas para proteína tau, responsável pela estabilidade e o funcionamento adequado do sistema microtubular intraneuronal que são co-localizados com células severamente distróficas (fragmentadas) em vez de células microgлияis ativadas (Streit et al., 2009) e, até o presente momento, não foram encontrados estudos publicados com um padrão de células distróficas em pacientes com epilepsia. Portanto, os dados do nosso trabalho podem ser os primeiros a descrever esse fenômeno em pacientes com epilepsia. Precisamos obter, no entanto, um número maior de material para analisar os hipocampus e chegar a mesma conclusão.

Aspectos gerais do padrão comportamental

Nesse trabalho não realizamos nenhuma análise comportamental nos pacientes estudados acima no processo pós-operatório. Nosso objetivo foi somente descrever o que existe na literatura em relação a alterações comportamentais de pacientes com ELT e fazer um correlato direto com o nosso trabalho.

As citocinas periféricas afetam a função do sistema nervoso central (SNC), manifestando-se em sintomas de ansiedade e declínio cognitivo. Um estudo investigou os efeitos da administração central de um medicamento recombinante humano que se liga a uma citocina pró-inflamatória, diminuindo sua ação em processos inflamatórios ligados a doenças neurológicas. O resultado mostrou uma melhora no comportamento semelhante à ansiedade, mas não houve melhora da memória espacial e isto foi associado a diminuição nos números da microglia hipocampal. Este resultado sugeriu, portanto, que esse medicamento recupera o comportamento semelhante à ansiedade, possivelmente mediado por

uma redução da inflamação central relacionada a citocina pro-inflamatória (Camara et al., 2015).

Muitos estudos relacionados à ELT são realizados em ratos ou camundongos e as avaliações comportamentais são baseadas em testes utilizando o campo aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE), labirinto radial de 8 braços, por exemplo, para verificar quantidade de erros e acertos. Já os testes comportamentais realizados em humanos baseiam-se em uma avaliação neuropsicológica, geralmente, realizada antes do procedimento cirúrgico dos pacientes para o controle das crises, estabelecendo parâmetros para possíveis riscos e seqüelas, principalmente no que se refere à linguagem e memória. Permite, também, uma comparação com base quantitativa e qualitativa entre os períodos pré e pós-operatório (Camara et al., 2015; Cardoso et al., 2018; Helena, Noffs, Magila, Regina, & Marques, 2002).

É imprescindível que um protocolo de avaliação comportamental deve ser implementado para todos os pacientes que forem submetidos à hipocampectomia, com a presença de testes para lateralidade, como questionário de lateralidade; teste de nível intelectual, como vocabulário (WAIS-R) e o teste de cubos (Wechsler adult intelligence scale-revised – WAIS-R); atenção e funções executivas com o teste de dígitos (Wechsler memory scale-revised – WMS-R) ou o Teste tapping (WMS-R); Praxia construtiva, com o teste de figura complexa de Rey (Rey-Osterrieth complex figure test – CFT); linguagem, com o teste fluência verbal (FAS Test), dentre outros (Helena et al., 2002).

Portanto, é importante destacar que a avaliação do desempenho cognitivo global, assim como determinar as alterações específicas de atenção, memória, linguagem e funções executivas são os processos básicos para a construção e desenvolvimento das habilidades intelectuais. Assim, os testes para a avaliação de pacientes com epilepsia devem levar em consideração qual a localização do foco epiléptico (Helena et al., 2002) para que tenhamos um diagnóstico assertivo a respeito dos benefícios da cirurgia hipocampal.

Referências

- About, O., Mrak, R. E., Boop, F. A., & Griffin, W. S. T. (2014). Epilepsy: Neuroinflammation, neurodegeneration, and APOE genotype. *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-41>
- Arend, J., Kegler, A., Caprara, A. L. F., Almeida, C., Gabbi, P., Pascotini, E. T., ... Figuera, M. R. (2018). Depressive, inflammatory, and metabolic factors associated with cognitive impairment in patients with epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, 86, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.07.007>
- Arisi, G. M. (2014). Nervous and immune systems signals and connections: Cytokines in hippocampus physiology and pathology. *Epilepsy and Behavior*, 38, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.01.017>
- Berilgen, M. S., Sari, T., Bulut, S., & Mungen, B. (2004). Effects of epilepsy on autonomic nervous system and respiratory function tests. *Epilepsy and Behavior*, 5(4), 513–516. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2004.04.003>
- Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. R. (2013). Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(1), 3–18. <https://doi.org/10.1111/nan.12011>
- Borsini, A., Zunszain, P. A., Thuret, S., & Pariante, C. M. (2015). The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends in Neurosciences*, 38(3), 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.12.006>
- Camara, M. Lou, Corrigan, F., Jaehne, E. J., Jawahar, M. C., Anscomb, H., & Baune, B. T. (2015). Effects of Centrally Administered Etanercept on Behavior, Microglia, and Astrocytes in Mice Following a Peripheral Immune Challenge. *Neuropsychopharmacology*, 40(2), 502–512. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.199>
- Cardoso, G., Sousa, L., Gama, J., Leal, W., Franco, E., Gomes, F., ... Lima, S. (2018,

- September 6). *Preservação cognitiva em ratos após hipocampectomia unilateral: modelo experimental para estudo de neurogênese hipocampal contralateral*. (Ome 5000), 8–9. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1672631>
- Choi, J., & Koh, S. (2008). Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Medical Journal*, 49(1), 1–18. <https://doi.org/10.3349/ymj.2008.49.1.1>
- Curfs, J. H. A. J., Meis, J. F. G. M., & Hoogkamp-Korstanje, J. A. A. (1997). A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 742–780.
- da Cunha, A., Jefferson, J. J., Tyor, W. R., Glass, J. D., Jannotta, F. S., & Vitkovic, L. (1993). Gliosis in human brain: relationship to size but not other properties of astrocytes. *Brain Research*, 600(1), 161–165. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90415-J](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90415-J)
- de Oliveira, C. M. B., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), 255–265. [https://doi.org/10.1016/S0034-7094\(11\)70029-0](https://doi.org/10.1016/S0034-7094(11)70029-0)
- Eichenbaum, H. (2017). Memory: Organization and Control. *Annual Review of Psychology*, 68(1), 19–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010416-044131>
- Elger, C. E., Johnston, S. A., & Hoppe, C. (2017). Diagnosing and treating depression in epilepsy. *Seizure*, 44, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.10.018>
- Eyo, U. B., Murugan, M., & Wu, L. J. (2017). Microglia–Neuron Communication in Epilepsy. *Glia*, 65(1), 5–18. <https://doi.org/10.1002/glia.23006>
- Fernandes, M. J. da S. (2013). Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. *Estudos Avançados*, 27(77), 85–98. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100007>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., ... Wiebe, S. (2014). *Relato oficial da ILAE: Uma definição prática de epilepsia*. 1–18. Retrieved from <http://epilepsia.org.br/wp-content/themes/moqueca/images/Relato->

oficial-da-ILAE-Uma-definição-pratica-de-epilepsia.pdf

Fisher, R. S., Boas, W. V. E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005).

Fisher_Ilae_2005. 46(4), 1–3. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(87\)90293-1](https://doi.org/10.1016/0021-9797(87)90293-1)

Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., ... Zuberi, S.

M. (2018). Operational classification of seizure types by the International League

Against Epilepsy: position paper of the ILAE Commission for Classification and

Terminology. *Zeitschrift Fur Epileptologie*, 31(4), 272–281.

<https://doi.org/10.1007/s10309-018-0216-8>

Frigerio, F., Flynn, C., Han, Y., Lyman, K., Lugo, J. N., Ravizza, T., ... Bernard, C. (2018).

Neuroinflammation Alters Integrative Properties of Rat Hippocampal Pyramidal Cells.

Molecular Neurobiology, 55(9), 7500–7511. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0915-1>

Gaitatzis, A., Carroll, K., Majeed, A., & Sander, J. W. (2004). The epidemiology of the

comorbidity of epilepsy in the general population. *Epilepsia*, 45(12), 1613–1622.

<https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.17504.x>

Gao, F., Gao, Y., Zhang, S. J., Zhe, X., Meng, F. L., Qian, H., ... Li, Y. J. (2017). Alteration

of plasma cytokines in patients with active epilepsy. *Acta Neurologica Scandinavica*,

135(6), 663–669. <https://doi.org/10.1111/ane.12665>

Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: Mechanism and

functions. *Immunity*, 32(5), 593–604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>

Greter, M., Lelios, I., & Croxford, A. L. (2015). Microglia versus myeloid cell nomenclature

during brain inflammation. *Frontiers in Immunology*, 6(3), 1–7.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00249>

Helena, M., Noffs, S., Magila, M. C., Regina, A., & Marques, C. M. (2002). Avaliação

Neuropsicológica de Pessoas com Epilepsia . Visão Crítica dos Testes Empregados na

População Brasileira. *Neurologia*, 10(2), 83–93.

- Helmstaedter, C., & Witt, J. A. (2017). Epilepsy and cognition – A bidirectional relationship? *Seizure*, *49*, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2017.02.017>
- Ho, Y. H., Lin, Y. Te, Wu, C. W. J., Chao, Y. M., Chang, A. Y. W., & Chan, J. Y. H. (2015). Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. *Journal of Biomedical Science*, *22*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0157-8>
- Hoeksema, M. A., & de Winther, M. P. J. (2016). Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Function. *Antioxidants & Redox Signaling*, *25*(14), 758–774. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6695>
- Hume, D. A. (2015). The many alternative faces of macrophage activation. *Frontiers in Immunology*, *6*(JUL), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00370>
- Laterza, C., Uoshima, N., Tornero, D., Wilhelmsson, U., Stokowska, A., Ge, R., ... Kokaia, Z. (2018). Attenuation of reactive gliosis in stroke-injured mouse brain does not affect neurogenesis from grafted human iPSC-derived neural progenitors. *PLoS ONE*, *13*(2), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192118>
- Leal, B., Chaves, J., Carvalho, C., Rangel, R., Santos, A., Bettencourt, A., ... Costa, P. P. (2017). Brain expression of inflammatory mediators in Mesial Temporal Lobe Epilepsy patients. *Journal of Neuroimmunology*, *313*(June), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.10.014>
- Liu, B. I. N., & Hong, J. (2014). *Nj7526-299a*. *304*(1), 1–2. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.035048.logical>
- Motta-Teixeira, L. C., Takada, S. H., Machado-Nils, A. V., Nogueira, M. I., & Xavier, G. F. (2016). Spatial learning and neurogenesis: Effects of cessation of wheel running and survival of novel neurons by engagement in cognitive tasks. *Hippocampus*, *26*(6), 794–803. <https://doi.org/10.1002/hipo.22560>

- Mourão Júnior, C. A., & Faria, N. C. (2015). Memória. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, 28(4), 780–788. <https://doi.org/10.1590/1678-7153.201528416>
- Nabeshima, S., Nomoto, M., Matsuzaki, G., Kishihara, K., Taniguchi, H., Yoshida, S. I., & Nomoto, K. (1999). T-cell hyporesponsiveness induced by activated macrophages through nitric oxide production in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 67(7), 3221–3226.
- Ravizza, T., Rizzi, M., Perego, C., Richichi, C., Velísková, J., Moshé, S. L., ... Vezzani, A. (2005). Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia*, 46(SUPPL. 5), 113–117. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.01006.x>
- Sander, J. W. A. S., & Shorvon, S. D. (1996). Epidemiology of the epilepsies Methodological issues. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 61(5), 433–443. <https://doi.org/10.1136/jnnp.61.5.433>
- Schuele, S. U., & Lüders, H. O. (2008). Intractable epilepsy: management and therapeutic alternatives. *The Lancet Neurology*, 7(6), 514–524. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70108-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70108-X)
- Scorza, F. A., Arida, R. M., Monterazzo Cysneiros, R., Scorza, C. A., De Albuquerque, M., & Abrão Cavalheiro, E. (2005). Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 63(2), 283–288.
- Spencer, S., & Huh, L. (2008). Outcomes of epilepsy surgery in adults and children. *The Lancet Neurology*, 7(6), 525–537. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70109-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70109-1)
- Streit, W. J., Braak, H., Xue, Q. S., & Bechmann, I. (2009). Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 118(4), 475–485. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0556-6>

- Tanuri, F. da C., Thomaz, R. B., & Tanuri, J. A. (2000). Epilepsia do lobo temporal com aura de prazer: Relato de caso. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, *58*(1), 178–180.
<https://doi.org/10.1590/S0004-282X2000000100028>
- Tay, T. L., Savage, J. C., Hui, C. W., Bisht, K., & Tremblay, M. È. (2017). Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *Journal of Physiology*, *595*(6), 1929–1945. <https://doi.org/10.1113/JP272134>
- Toni, N., & Schinder, A. F. (2016). Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(1), a018903. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018903>
- Trivedi, J. (2006). Cognitive deficits in psychiatric disorders: Current status. *Indian Journal of Psychiatry*, *48*(1), 10. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.31613>
- Valotta, A., & Cabral, F. R. (2008). Ictogênese , Epileptogênese e Mecanismo de Ação das Drogas na Profilaxia e Tratamento da Epilepsia. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, *14*(2), 39–45.
- Vezzani, A. (2014). Epilepsy and Inflammation in the Brain. *Epilepsy Current*, *14*, 3–7.
<https://doi.org/https://doi.org/10.5698/1535-7511-14.s2.3>
- Vezzani, A., Aronica, E., Mazarati, A., & Pittman, Q. J. (2013). Epilepsy and brain inflammation. *Experimental Neurology*, *244*, 11–21.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.033>
- Vezzani, A., & Rüegg, S. (2011). Immunity and inflammation in epilepsy: Introduction. *Epilepsia*, *52*(Suppl.3), 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03028.x>
- Vinet, J., Vainchtein, I. D., Spano, C., Giordano, C., Bordini, D., Curia, G., ... Biagini, G. (2016). Microglia are less pro-inflammatory than myeloid infiltrates in the hippocampus of mice exposed to status epilepticus. *Glia*, *64*(8), 1350–1362.
<https://doi.org/10.1002/glia.23008>

- Von Ehrenstein, O. S., Neta, G. I., Andrews, W., Goldenberg, R., Goepfert, A., & Zhang, J. (2012). Child intellectual development in relation to cytokine levels in umbilical cord blood. *American Journal of Epidemiology*, *175*(11), 1191–1199. <https://doi.org/10.1093/aje/kwr393>
- Whelan, C. D., Altmann, A., Botía, J. A., Jahanshad, N., Hibar, D. P., Absil, J., ... Sisodiya, S. M. (2018). Structural brain abnormalities in the common epilepsies assessed in a worldwide ENIGMA study. *Brain*, *141*(2), 391–408. <https://doi.org/10.1093/brain/awx341>
- Wu, L., Li, Y., Yu, M., Yang, F., Tu, M., & Xu, H. (2018). Notch signaling regulates microglial activation and inflammatory reactions in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neurochemical Research*, *43*(6), 1269–1282. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2544-5>
- Yacubian, E. M. T., & Kochen, S. (2014). *Crises epilépticas*. <https://doi.org/10.1080/14660820310006724rHF97PE40912DQ9PL> [pii]
- Yroni, A., Arbus, C., Valton, L., & Schmitt, L. (2017). Troubles de l’humeur et chirurgie de l’épilepsie : une revue de la littérature. *Encephale*, *43*(2), 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.encep.2016.02.015>
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.*, *69*(2), 482–489. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e.Cytokines>
- Zhao, X., Liao, Y., Morgan, S., Mathur, R., Feustel, P., Mazurkiewicz, J., ... Huang, Y. (2018). Noninflammatory Changes of Microglia Are Sufficient to Cause Epilepsy. *Cell Reports*, *22*(8), 2094–2106. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.004>
- Zheng, H., Wang, X., Wang, W., Zhao, H., Li, Z., & Zhu, W. (2009). Kainic Acid-Activated Microglia Mediate Increased Excitability of Rat Hippocampal Neurons in vitro and in vivo: Crucial Role of Interleukin-1beta. *Neuroimmunomodulation*, *17*(1), 31–38.

<https://doi.org/10.1159/000243083>

ANEXOS

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa **RELAÇÃO ENTRE NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL E HISTÓRIA DE VIDA EM PACIENTES ADULTOS COM EPILEPSIA REFRACTÁRIA DO LOBO TEMPORAL**, que tem como pesquisadora responsável a Prof. Dra. Silene Maria Araújo de Lima, que pode ser contatada pelo e-mail: silenelim@gmail.com e no tel: 3201-8177, ou no endereço: Instituto de Ciências Biológicas, UFPA, Av. Perimetral, 2-224 - Guamá, Belém/PA, 66075-110, tendo também a pesquisadora participante Jessica Silva Gama, aluna de mestrado, a qual pode ser contatada pelo e-mail: jessiicagama@yahoo.com.br, cel: (91) 98086-4344, para esclarecimentos sobre a pesquisa. O projeto tem por objetivo caracterizar as células neurogênicas (células novas) dos hipocampos (parte do cérebro) retirados nas cirurgias de epilepsia e os perfis de história de vida dos pacientes com epilepsia do lobo temporal. O trabalho se baseou nos estudos sobre epilepsia, onde não se encontra esclarecido o processo pelo qual uma pessoa torna-se epilética, o estudo é relevante para um melhor entendimento da epilepsia e do processo de início da doença. Para alcançar o nosso objetivo, todos os participantes deverão responder um questionário sobre sua história de vida. O material dos pacientes submetidos a cirurgia de corticoamigdalohipocampectomia (remoção de partes do cérebro do paciente) será captado após a retirada do tecido, sendo uma parte para estudos patológicos no hospital e o restante do material retirado será utilizado no estudo. Os participantes selecionados deverão ter epilepsia do lobo temporal, ter entre 18-60 anos e não ter outra patologia neurológica. Há a possibilidade de sua identidade ser revelada, entretanto se fará o possível para que ela continue em sigilo, uma vez que as informações de identificação obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os participantes do projeto de pesquisa receberão orientações sobre a epilepsia e material informativo sobre auto-cuidado. Não haverá nenhum gasto com sua participação. Não haverá nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação. A pesquisa seguirá os aspectos éticos estabelecidos na resolução 196/1996 do CNS (Conselho Nacional de Saúde), que define os critérios bioéticos da pesquisa em seres humanos. No caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento. Sua participação não é obrigatória, e a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador(a) ou com a instituição. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o e-mail e endereço

profissional da pesquisadora principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação a qualquer momento. Em caso de necessidade, você pode também entrar em contato direto com o Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical, situado a Av. Generalíssimo Deodoro, 92 – Umarizal, 1º andar, ou pelo telefone (91) 3201-0961 ou e-mail cepbel@ufpa.br.

Assinatura do pesquisador

Declaro que eu fui informado sobre os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e porque o pesquisador precisa da minha colaboração, tendo entendido a explicação. Por isso, eu concordo em participar, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Belém, ____ de _____ de 20__

Assinatura do participante