



Universidade Federal do Pará

Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

RELAÇÃO ENTRE NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL E HISTÓRIA CLÍNICA DE
PACIENTES ADULTOS PORTADORES DE EPILEPSIA REFRACTÁRIA DO LOBO TEMPORAL

Belém – PA

2018



Universidade Federal do Pará

Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

RELAÇÃO ENTRE NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL E HISTÓRIA CLÍNICA DE
PACIENTES ADULTOS PORTADORES DE EPILEPSIA REFRATÁRIA DO LOBO TEMPORAL

Jessica Silva Gama

Dissertação submetida ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Silene Maria Araújo de Lima.

Coorientadora: Profa. Dra. Regina Célia Gomes de Sousa.

Belém – PA

2018

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

- G184r Gama, Jessica Silva
RELAÇÃO ENTRE NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL E HISTÓRIA CLÍNICA DE PACIENTES
ADULTOS PORTADORES DE EPILEPSIA REFRACTÁRIA DO LOBO TEMPORAL / Jessica Silva Gama.
— 2018
72 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - , Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Silene Maria Araújo de Lima
Coorientação: Profa. Dra. Regina Célia Gomes de Sousa.
1. Epilepsia. 2. Epilepsia do Lobo Temporal. 3. Neurogênese. 4. Células Granulares. 5. História Clínica. I.
de Lima, Silene Maria Araújo, *orient.* II. Título

CDD 612.8



Universidade Federal do Pará

Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

Candidata: Jéssica Silva Gama

Data da Defesa: 13/09/2018

Resultado: Aprovada.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Silene Maria Lima de Araújo (UFPA) – Orientadora

Prof. Dr. Regina Célia Gomes de Sousa. (UFPA) – Orientadora (UFPA) – Coorientador

Prof. Dr. Edna Cristina Santos Franco (IEC) – Membro

Profa. Dra. Francinaldo Lobato Gomes (HOL) - Membro

Profa. Dra. Soraia Valéria de Oliveira Coelho Lameirão (UFPA) - Suplente

AGRADECIMENTOS

À minha família que me ensinou a buscar meus objetivos e que esteve do meu lado sempre que precisei. Em especial ao meu avô e minha avó por todos os ensinamentos e cuidados ao longo da minha vida. Agradeço em especial, também, ao meu marido por ser tão companheiro e compreensível.

Aos professores do PPGNC por toda a ajuda e ensinamentos ao longo desses anos. Em especial a minha orientadora Profa. Silene Maria Araújo de Lima por todo o aprendizado sobre a vida acadêmica e profissional. À minha coorientadora Profa. Regina Célia Gomes de Sousa por ser tão solícita e me receber tão bem em seu grupo de pesquisa. Aos professores Olavo Galvão e Alda Henriques por terem sido tão atenciosos com o meu projeto na disciplina de seminários. Aos coordenadores do programa, Professores Paulo Goulart e Fernando Allan por toda disponibilidade de ajuda. Aos secretários e estagiários do programa que sempre me atenderam muito bem. Aos meus colegas de turma por dividirem as aulas, as incertezas e certezas.

Agradeço aos amigos que fiz ao longo desse percurso, as amizades estabelecidas foram essenciais para manter o equilíbrio e o sorriso no rosto nos momentos de tensão (obrigada, migs). Aos meus amigos de laboratório, aos meus amigos do Geape, aos meus amigos que não faziam parte da minha turma ou grupo de pesquisa, e me acolheram mesmo assim.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa, o Epilepsia Norte, o qual somou muito para a minha formação quanto aos conhecimentos sobre a epilepsia. A todos os profissionais e professores que contribuíram para meu trabalho. Em especial o Dr. Francinaldo Gomes, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, Prof. Dr. Antônio Pereira, Profa. Dra. Elane Magno, Profa. Dra. Soraia Lameirão e a todos os que apresentaram seminários e se dispuseram a compartilhar seus conhecimentos sobre epilepsia. Aos integrantes do laboratório de Neurobiologia e integrantes do Geape pela disposição em ajudar, muito obrigada.

Agradeço a Profa. Edna Franco pela acessibilidade ao Instituto Evandro Chagas, uma vez que a mesma foi essencial para a realização deste trabalho. Aos membros da minha banca pela disponibilidade e aceite.

Agradeço às agências CNPQ e CAPES pelo financiamento parcial dessa pesquisa por meio de concessão de bolsa de estudos.

Por fim, agradeço em especial a todos os participantes dessa pesquisa e a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a mesma.

RESUMO

A epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado pela predisposição permanente do cérebro em gerar crises epiléticas, e que atinge cerca de 1% da população mundial. No Brasil, a doença pode atingir de 2% a 4% da população. A maioria dos pacientes apresenta um bom prognóstico ao tratamento medicamentoso, todavia 30% dos pacientes apresentam refratariedade ao tratamento. Entre as epilepsias que não apresentam um bom prognóstico encontra-se a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT). A ELT é caracterizada morfológicamente por uma perda seletiva de neurônios do hipocampo, concomitantemente ao aumento da neurogênese hipocampal. Acredita-se que essa neurogênese exacerbada contribua para a epileptogênese (surgimento da epilepsia), entretanto, o papel dessa neurogênese aumentada em pacientes com ELT continua uma incógnita. Utilizamos hipocampos de pacientes portadores de epilepsia, os quais foram submetidos a um processo cirúrgico, no qual foi realizada a ressecção hipocampal unilateral. A partir da análise dos mesmos, investigou-se uma possível relação entre padrões neurogênicos com a evolução da doença. As entrevistas com os pacientes que foram submetidos à cirurgia demonstraram que o evento desencadeador (precipitante) da epilepsia ocorreu nos primeiros anos de vida dos pacientes, além disso, foram eventos de alta intensidade, e apresentaram, também, uma frequência elevada de crises epiléticas e refratariedade medicamentosa. A análise imunohistoquímica dos hipocampos mostrou de maneira equivalente que houve uma dispersão perceptível da camada de células granulares, indicando uma possível migração ectópica na marcação para neuroblastos (neurônios imaturos), os quais são gerados na neurogênese. Os resultados obtidos nesse trabalho são pioneiros, dado que os mesmos se fundamentam tanto em achados clínicos como histopatológicos, e a relação apresentada entre a neurogênese hipocampal e história clínica propõe uma nova visão de investigação. Esses achados podem auxiliar, ainda, em uma nova perspectiva de tratamento diferenciado nas epilepsias do lobo temporal.

Palavras-chave: epilepsia, epilepsia do lobo temporal, neurogênese, células granulares, história clínica.

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder characterized by the permanent predisposition of the brain to generate epileptic seizures, which affects about 1% of the world population. In Brazil, the disease can reach 2% to 4% of the population. Most patients have a good prognosis for drug treatment, however 30% of patients are refractory to treatment. Among the epilepsies that do not present a good prognosis is the Temporal Lobe Epilepsy (ELT). ELT is characterized morphologically by a selective loss of hippocampal neurons, concomitantly with increased hippocampal neurogenesis. It is believed that this exacerbated neurogenesis contributes to epileptogenesis (onset of epilepsy); however, the role of this increased neurogenesis in patients with TLE remains unknown. We used hippocampus from patients with epilepsy, who underwent a surgical procedure in which unilateral hippocampal resection was performed. From the analysis of the same, a possible relationship between neurogenic patterns and the evolution of the disease was investigated. Interviews with patients who underwent surgery demonstrated that the triggering event (precipitant) of epilepsy occurred in the first years of life of the patients. In addition, they were high intensity events, and also presented a high frequency of epileptic seizures and drug refractoriness. Immunohistochemical analysis of hippocampi showed equivalently that there was a perceptible dispersion of the granule cell layer, indicating a possible ectopic migration in labeling for neuroblasts (immature neurons), which are generated in neurogenesis. The results obtained in this work are pioneer, given that they are based on both clinical and histopathological findings, and the relationship between hippocampal neurogenesis and clinical history proposes a new research vision. These findings may also help in a new perspective of differential treatment in temporal lobe epilepsies.

Keywords: epilepsy, temporal lobe epilepsy, neurogenesis, granular cells, clinical history

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BrdU	5-bromo-3'-de oxiuridina
BSA	Bovine Serum Albumin
CA	Corno de Amon
CE	Crises Epilépticas
DAB	Diaminobenzidine
DCX	Doublecortin
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
GD	Giro Dentado
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HE	Hematoxilina-Eosina
IEC	Instituto Evandro Chagas
ILAE	International League Against Epilepsy (Liga Internacional contra Epilepsia)
“M”	Concentração Molar
NeuN	Neuronal Nuclei
PBS	Phosphate Buffered Saline
SAPAT	Secção de Patologia
SGZ	Subgranular Zone
SIC	Segundo Informações Colhidas
SPA	Separação de Padrões
SUDEP	Sudden Unexpected Death in Epilepsy (Morte Inesperada Súbita em Epilepsia)
SVZ	Subventricular Zone
UFPA	Universidade Federal do Pará

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados dos anticorpos primários.....	26
Tabela 2. Dados gerais dos pacientes.....	28
Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes.....	29
Tabela 4. Relação da imunorreatividade dos anticorpos usados em cada amostra.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama Esquemático do Complexo Hipocampal.....	16
Figura 2. Figura Esquemática das Camadas do Giro Dentado.....	17
Figura 3. Subtipos Histopatológicos da Esclerose Hipocampal em Pacientes Portadores de ELT.....	18
Figura 4. Fotomicrografia da área do GD do Hipocampo da Amostra Coleta dos Pacientes Portadores de ELT com Marcação Positiva para Anti-NeuN.....	31
Figura 5. Fotomicrografia em maior aumento do GD da Amostra Coletada dos Pacientes Portadores de ELT com Marcação Positiva para Anti-NeuN.....	32
Figura 6. Fotocomposição de achados Histopatológicos no GD em Indivíduos Controle e na Imunomarcção para NeuN nas Amostras Coletadas.....	33
Figura 7. Fotomicrografia em maior aumento do GD da Amostra Coletada dos Pacientes Portadores de ELT com Marcação Positiva para Anti-DCX.....	34
Figura 8. Fotomicrografia em maior aumento do GD da amostra coletada dos pacientes portadores de ELT com marcação positiva para Anti-GFAP.....	35
Figura 9. Fotomicrografia em maior aumento de áreas adjacentes ao GD da amostra coletada dos pacientes portadores de ELT com marcação positiva para Anti-GFAP.....	36
Figura 10. Fotocomposição contendo um diagrama esquemático das camadas de GD e as fotomicrografias obtidas da amostra coletada dos pacientes portadores de ELT.....	37

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
OBJETIVOS.....	23
<i>Geral</i>	23
<i>Específicos</i>	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
<i>Participantes</i>	24
<i>Procedimentos</i>	24
<i>Captação e Preparação de Tecidos</i>	25
<i>Análise Morfológica do Hipocampo</i>	26
<i>Análise da História Clínica</i>	27
RESULTADOS.....	27
<i>Dados Gerais</i>	27
<i>Dados Anatômicos dos Hipocampos de Pacientes Portadores de ELT</i>	30
<i>Padrão de Marcação Imunohistoquímica para NeuN</i>	31
<i>Padrão de Marcação Imunohistoquímica para DCX</i>	33
<i>Padrão de Marcação Imunohistoquímica para GFAP</i>	34
<i>Plano Geral da Marcação Imunohistoquímica</i>	36
DISCUSSÃO.....	38
<i>História Clínica dos Pacientes</i>	38
<i>Padrão de Marcação Imunohistoquímica</i>	40
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS	
Anexo A	
Anexo B	

INTRODUÇÃO

A epilepsia é retratada há muito tempo na história da humanidade, encontrando-se relatos em um texto de 2000 a.C em linguagem acadiana (língua falada na antiga Mesopotâmia) que provavelmente seria de uma crise epiléptica. Entretanto o termo “epilepsia” foi referido pela primeira vez na Grécia antiga, derivando do verbo grego *epilambanein*, que significa “tomar posse” ou “atacar”, remetendo-se provavelmente ao fato das doenças da época serem associadas a possessão (Temkin, 1994; Masia & Devinsky, 2000).

A história da epilepsia esteve atrelada às crenças por muito tempo. Na Roma antiga, por exemplo, as pessoas evitavam os epiléticos por medo de contágio. Na Idade Medieval, onde o pensamento religioso ganhou grandes proporções, foi lançado o livro de caça às bruxas, *Mallus Maleficarum*, escrito por dois frades dominicanos vinculados à inquisição católica. Neste tratado, a presença de crises epiléticas era uma característica de feitiçaria, o qual fez as mulheres epiléticas serem perseguidas como bruxas, resultando na perseguição, tortura e morte de mais de 100.000 mulheres. Em contraponto, na época do Renascimento buscou-se outras formas de ver a epilepsia, tratando-a como uma doença de manifestação física, não mais como algo obscuro, místico. Entretanto, foi no Iluminismo que ela começou a ser vista de forma mais moderna, com a ajuda dos avanços da anatomia, patologia, química, farmácia e fisiologia (Masia & Devinsky, 2000).

Na atualidade, sabe-se que a epilepsia é uma alteração cerebral caracterizada pela propensão permanente em gerar crises epiléticas, as quais podem ser convulsivas (reconhecidas pelo abalo motor) e não-convulsivas (Fisher et al, 2005). Convulsões são alterações paroxísticas (disfunções) na atividade elétrica do cérebro de forma global. A crise epilética (CE), por sua vez, é a manifestação clínica de um distúrbio cerebral, caracterizada por descargas anormais, excessivas, simultâneas, de neurônios que se situam principalmente no córtex cerebral, a qual normalmente tem um decurso limitado e determinado, com segundos ou poucos minutos de duração (Bate & Gardner, 1999; Yacubian, 2002; Goldberg & Coulter, 2013).

Em relação ao tempo, as crises epilépticas são denominadas breves ao durarem menos de 5 minutos, enquanto convulsões prolongadas duram entre 5 e 30 minutos, se a CE perdurar por mais de 30 minutos é qualificada como status epilepticus, essa crise pode ser uma crise contínua, ou seja, a pessoa acometida fica em crise durante todo o tempo, ou ser duas ou mais crises sequenciais sem recuperação completa da consciência entre elas (Glauser, 2007).

Ademais, a repetição de duas ou mais CE não provocadas, ou seja, que não foram causadas por febre, traumatismo cranioencefálico, alteração hidreletrolítica ou doença concomitante configura um quadro de epilepsia (Jagtap, Mauskar & Naik, 2013). Além disto, as crises epilépticas são classificadas em parciais e generalizadas. As crises parciais são classificadas como simples e complexas, e se iniciam em uma região restrita do encéfalo. São denominadas simples quando não há perda de consciência, e denominadas complexas quando há perda de consciência. Nas crises generalizadas, por outro lado, as descargas epileptiformes se originam e/ou propagam-se concomitantemente nos dois hemisférios cerebrais (Swaiman & Ferriero, 2012).

O processo pelo qual o cérebro é previamente alterado funcionalmente e inclinado para a geração de atividade elétrica anormal que desencadeia as CE crônicas é chamado de epileptogênese. Há um grande número de fatores relacionados com a epileptogênese na história clínica dos pacientes, dentre eles os mais frequentes são: anomalia cerebral durante o desenvolvimento embrionário, traumatismo craniano, tumores, infecções e hemorragias encefálicas, anóxia durante o parto, crises convulsivas prolongadas e crises convulsivas que ocorrem em estados febris. Esses fatores podem ser o gatilho para a primeira crise do paciente, que é aguda, a qual acredita-se que seria o início para os processos que levam a epileptogênese. Acredita-se, também, que a epileptogênese pode ser influenciada por fatores como predisposição genética, mecanismos epigenéticos modulados pelo meio ambiente e uso de drogas (Kuruba, Hattiangady & Shetty, 2009; Fernandes, 2013; Goldberg & Coulter, 2013).

Estudos epidemiológicos apontam que cerca de 1% a 2% da população mundial seja epilética, atingindo mais de 65 milhões de pessoas no mundo. A epilepsia é apresentada como o transtorno crônico grave mais comum na clínica neurológica (Sander & Shorvon, 1996; Who, 2000; Thurman et al, 2011). A epilepsia é uma doença com alta prevalência, que afeta o convívio social dos pacientes e dos familiares, sendo relacionada a várias comorbidades psiquiátricas (Marchetti et al., 2005). Estima-se que a epilepsia atinja 5-8/1000 habitantes em países “desenvolvidos” e 10-13/1000 habitantes em países “em desenvolvimento”, e esses dados são ainda maiores em zonas rurais (Ngugi et al, 2010; Thurman et al, 2011). Essas diferenças regionais são associadas a fatores de risco para a epilepsia como: infecções, cuidados pré-natais e perinatais inadequados (Newton & Garcia, 2012). No Brasil, embora os estudos epidemiológicos sejam escassos, estima-se que a epilepsia atinja 2% a 4% da população, acometendo pessoas em diferentes idades e classes sociais (Marchetti et al., 2005).

A população portadora de epilepsia apresenta risco de óbito de duas a três vezes maior que os indivíduos da população em geral, e esse risco é cinco vezes maior para os pacientes com epilepsia focal farmacorresistente, ou seja, que não obtêm um bom prognóstico com tratamento medicamentoso (Hitiris et al, 2007; Ryvlin & Montavont, 2008; Ryvlin, Tomson & Montavont, 2009). Nos países “desenvolvidos” pessoas com epilepsia apresentam até cinco vezes mais risco de óbito que a população total dos mesmos, nos países “em desenvolvimento” essa taxa pode ser até 37 vezes maior que o restante da população local. Sabe-se também, que essa taxa de mortalidade é ainda maior em pessoas na faixa etária de 10-29 anos. Ademais, os índices de mortalidade são maiores nos primeiros anos após o início das crises epiléticas (Neligan, Bell, Shorvon & Sander, 2010; Fazel et al, 2013).

Essa alta taxa de mortalidade é associada a comorbidades (duas ou mais doenças concomitantes), afogamentos, status epilepticus e as mortes súbitas e inesperadas (SUDEP). O risco

de SUDEP vai aumentando com a cronicidade da doença e os candidatos cirúrgicos são os com maior risco, os mecanismos da SUDEP são desconhecidos (Tomson, Nashef & Ryvlin, 2008; Ryvlin, Tomson & Nashef, 2013).

Em relação as comorbidades, citadas anteriormente, sabe-se que as doenças psiquiátricas simultâneas com a epilepsia dificultam a resposta ao tratamento medicamentoso inicial e estão associadas ao risco de morte. Além do fato que algumas comorbidades psiquiátricas são fatores de risco para o desenvolvimento da epilepsia, e a epilepsia aumenta a probabilidade de desenvolvimento de comorbidades psiquiátricas, o que sugere causas e mecanismos compartilhados. Em relação a essa concomitância entre as doenças citadas, foi realizado um estudo que mostrou uma maior incidência de ansiedade ou transtorno depressivo duas vezes maior que na população em geral (Adelöw, Andersson, Ahlbom, & Tomson, 2012; Gaitatzis, Sisodiya & Sander, 2012; Hesdoffer et al, 2012; Fazel et al, 2013; Kanner, 2013).

No que se refere ao tratamento das epilepsias, a medicação antiepiléptica é a forma terapêutica mais utilizada, e cerca de dois terços dos pacientes epiléticos obtêm controle das crises com o uso regular dessa medicação em mono ou politerapia. Entretanto, cerca de 30% do total desses pacientes apresentam crises epiléticas refratárias, ou seja, não respondem ao tratamento realizado com os remédios disponíveis no mercado. Os pacientes que não respondem ao medicamento antiepiléptico inicial, diminuem a probabilidade de resposta proporcionalmente com o número de fármacos antiepiléticos testados sem sucesso. A ILAE define como refratariedade, a epilepsia resistente a fármacos antiepiléticos tolerados, adequadamente escolhidos e usados. As novas medicações não tem conseguido a remissão desses casos, tornando os pacientes com epilepsias refratárias possíveis candidatos ao tratamento cirúrgico (Perucca et al, 1998; Kwan & Brodie, 2000; Schiller & Najjar, 2008; Schuele & Lüders, 2008; Spencer & Huh, 2008; Kwan et al, 2010; Who, 2010; Brodie, Barry, Bamagous, Norrie & Kwan, 2012).

Conforme exposto, os pacientes com epilepsia refratária são candidatos ao tratamento cirúrgico, esse tratamento inclui ressecção, destruição ou desconexão do tecido cerebral epiléptico e neuroestimulação, que pode ser aplicada a várias estruturas cerebrais gerando convulsões ou anulando as convulsões, uma vez detectadas pelos sensores do neuroestimulador (Moshé, Perucca, Ryvlin & Tomson, 2015).

Entre as epilepsias que apresentam alto índice de refratariedade medicamentosa, encontram-se as parciais, as quais constituem a forma mais comum de epilepsia no adulto. Esse tipo de epilepsia é caracterizado pela predominância de crises parciais, restringindo-se, na maioria das vezes, a um hemisfério cerebral (Ilae, 1989; Guerreiro, 2002; Fernandes, 2013). O tipo de epilepsia mais comum entre as parciais é a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT), que será abordada no nosso estudo. A ELT representa aproximadamente 60% de todas as epilepsias parciais (Andersen et al., 2006).

Na ELT há um foco epiléptico comum, que é uma estrutura situada no lobo temporal, o hipocampo, o qual é subdividido anatomicamente em áreas denominadas CA1, CA2 e CA3. As outras regiões que formam o complexo hipocampal incluem o giro dentado, subiculum, presubiculum, parasubiculum e o córtex entorrinal (Lorente De Nó, 1933, 1934; Rubin & Safdieh, 2008).

Em uma visão microscópica do hipocampo nas ELTs, o achado mais conspícuo é uma perda seletiva de neurônios na formação hipocampal, a qual denomina-se esclerose hipocampal (Mcnamara, 1994). O achado clássico, neste tipo de esclerose, é uma grande perda das células piramidais das camadas CA1 e CA3, e das células musgosas da camada polimórfica do giro dentado (GD), também chamada de hilo ou CA4. Entretanto, as células piramidais de CA2 e as granulares do GD não apresentam esse mesmo padrão de ausência vista nas demais regiões (Meldrum & Bruton, 1992). Para uma melhor visualização, a formação do complexo hipocampal, as camadas do giro dentado e os achados histopatológicos típicos são mostrados nas figuras 1, 2 e 3, a seguir:

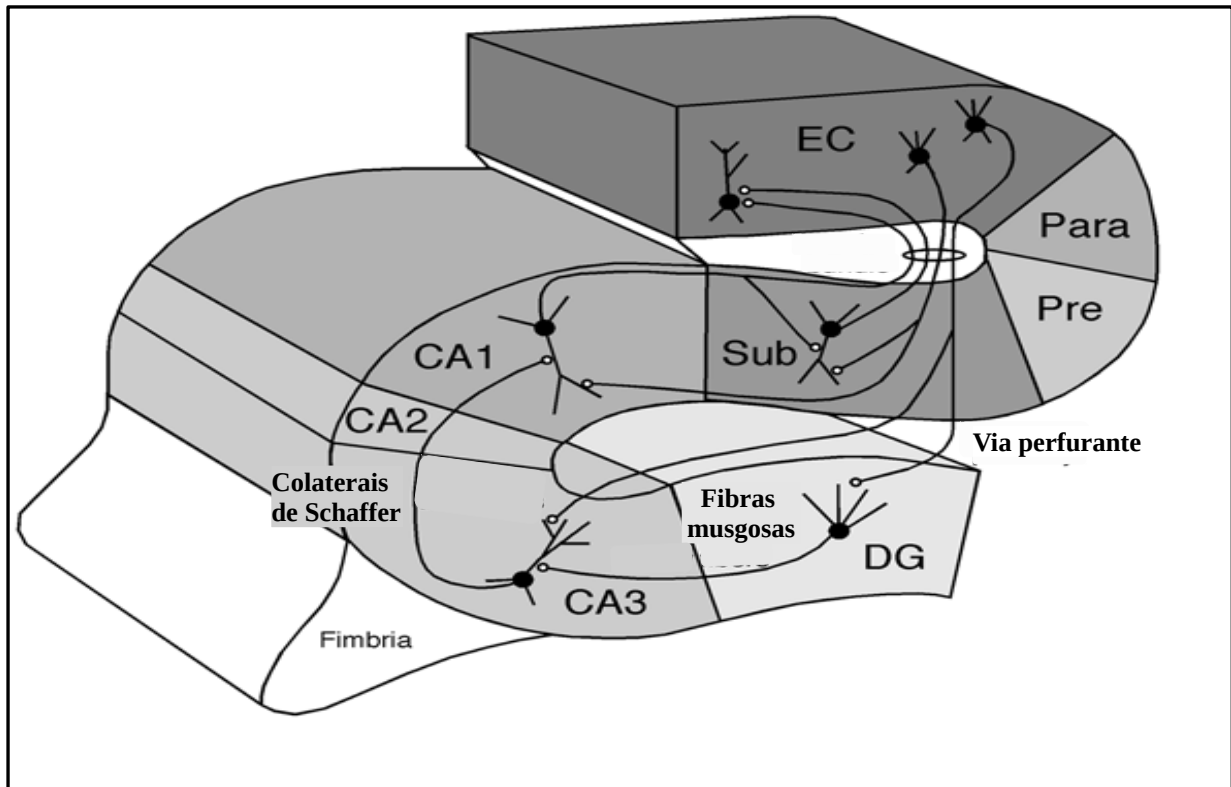


Figura 1. Diagrama esquemático do Complexo Hipocampal obtido de Andersen, 2006, adaptado e ilustrando as principais áreas hipocâmpais CA1, CA2 e CA3, Cortex Entorrinal (EC), parasubiculum (PARA) presubiculum (PRE) e subiculum (Sub) além do Giro Dentado (DG).

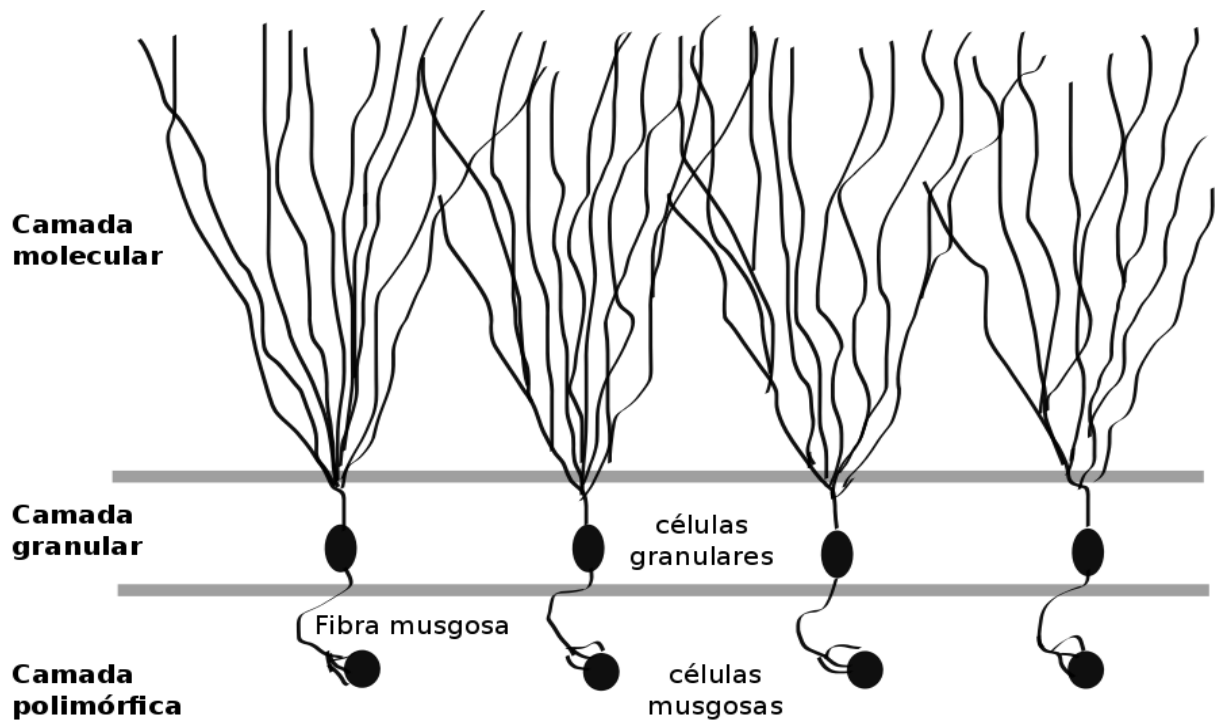


Figura 2. Figura esquemática das camadas do GD baseada em Andersen, 2006. A figura mostra as três camadas que formam o giro dentado. Os neurônios principais dessa camada encontram-se em destaque: as células granulares e as células musgosas, as quais são conectadas pelas fibras musgosas, como são conhecidos os axônios das células granulares.

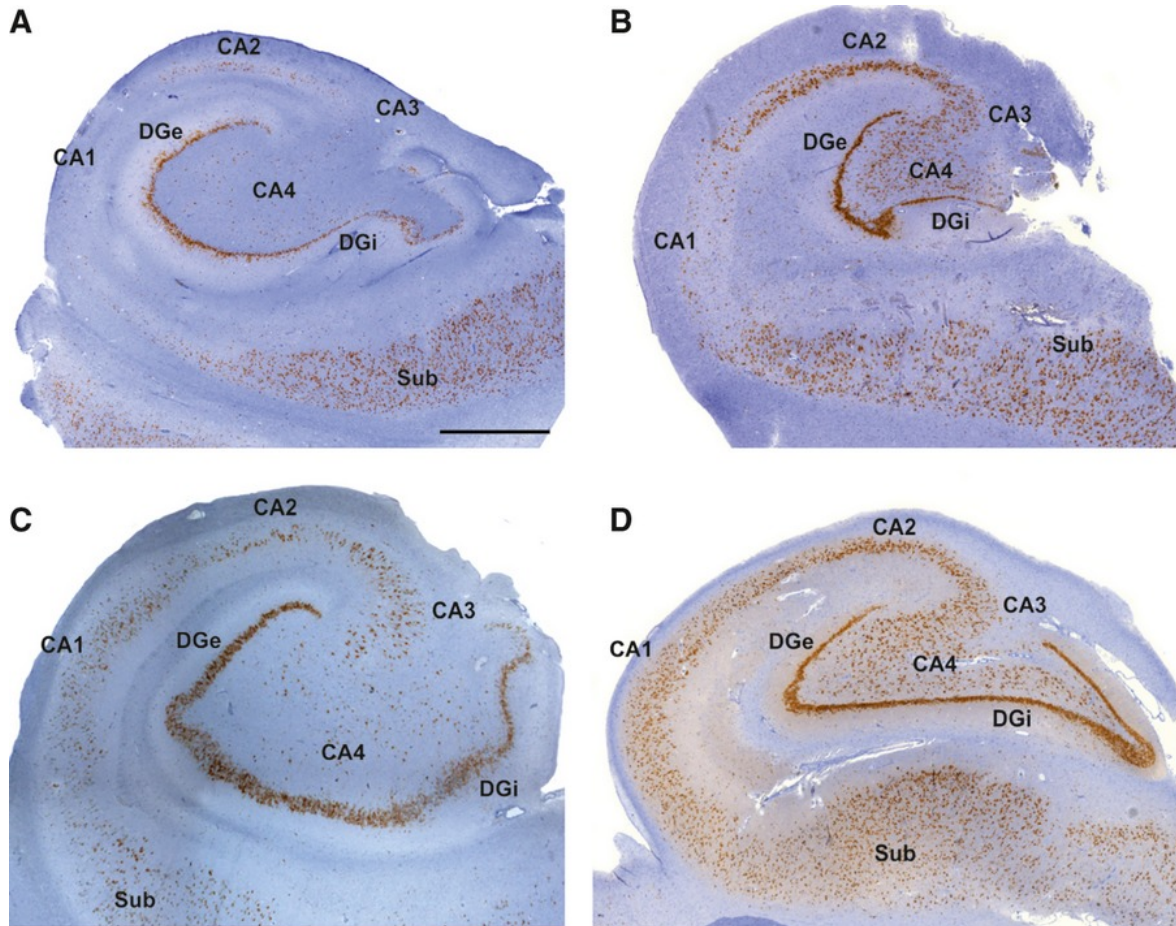


Figura 3. Subtipos histopatológicos de esclerose hipocampal em pacientes com ELT. As fotomicrografias mostram as perdas seletivas das células piramidais (perfis em tom marrom) nas regiões de CA1, CA2 e CA3 que acontecem na esclerose hipocampal e suas variações em A, B e C. A fotografia D é de um hipocampo sem esclerose, na qual há a marcação celular em toda a sua extensão. Obtida de Blümcke et al, 2013.

Os achados da esclerose hipocampal despertam interesse e indagações sobre como a funcionalidade do hipocampo se altera na epilepsia, haja vista o mesmo estar relacionado a várias funções primordiais para o funcionamento normal do cérebro adulto, tendo um papel importante na consolidação das informações, na memória de longo prazo, curto prazo e navegação espacial. Além dessas funções, o hipocampo é uma das áreas do encéfalo adulto que continua a ter neurogênese (Bergmann et al., 2012; Eriksson et al., 1998; Spalding et al., 2013).

Em relação a neurogênese, relatos históricos e estudos apontam que por muito tempo acreditou-se que novos neurônios não eram adicionados ao cérebro de um mamífero adulto (Cajal, 1913). O cenário, entretanto, começou a mudar na segunda metade do século XX, quando estudos mostraram evidências que tal fenômeno continuava na fase pós-natal de animais experimentais,

como em ratos e aves adultas (Altman, 1965; Altman, 1969; Kaplan & Hinds, 1977; Goldman & Nottebohm, 1983). Um grande marco nesse estudo surgiu na década de 1990 com o desenvolvimento do análogo sintético da timidina, o BrdU (5-bromo-3'-de oxitimidina), que é captado pelas células durante a fase de síntese, sendo, portanto, um marcador de células em proliferação (Nowakowski, Lewin & Miller, 1989).

Desde então, os estudos em mamíferos, inclusive na espécie humana, comprovaram que existem regiões onde se localizam células progenitoras mitoticamente ativas, capazes de gerar novos neurônios durante a fase adulta (Eriksson et al., 1998; Doetsch, et al., 1997; Gould, et al., 1998; Doetsch, et al., 1999). Essas regiões são a zona subventricular dos ventrículos laterais (SVZ, do inglês subventricular zone) e a zona subgranular (SGZ, do inglês, subgranular zone) do giro dentado do hipocampo, sendo a última localizada no ponto de encontro da camada interna de células granulares do giro dentado com a região hilar (Scorza et al., 2005; Tavares & Gomes-Leal, 2011).

O hipocampo, mais especificamente a SGZ, é provavelmente a região do cérebro de mamíferos adultos mais reafirmada como zona neurogênica, tanto em técnicas *in vivo*, quanto *in vitro* (Ming & Song, 2005). As células geradas no hipocampo se diferenciam em um tipo de neurônio específico: as células granulares (Seri et al., 2004).

Sabe-se que as novas células granulares do giro dentado apresentam propriedades funcionais similares aos neurônios maduros, como potenciais de ação, sinapses e aferências de outras regiões do circuito (Van Praag et al., 2002). No hipocampo adulto, a formação de novos neurônios parece ser importante para a modulação e refinamento dos circuitos neurais adultos, o que contribui para alguns tipos de memória dependentes do hipocampo, incluindo memória espacial (Sahay, Wilson & Hen, 2011). Alguns pesquisadores da área vislumbram uma outra funcionalidade para os neurônios formados, a “separação de padrões” (SPA), que é a capacidade de diferenciar nossas experiências cotidianas umas das outras, como, por exemplo, distinguir a diferença do local que se estacionou o

carro no dia anterior para o atual (Sahay, Wilson & Hen, 2011; Bakker et al, 2008; Tavares & Gomes-Leal, 2011).

Estudos mostram que a neurogênese é modulada por mecanismos fisiológicos e patológicos. Exercícios físicos e aprendizado são tidos como estimulantes da neurogênese, enquanto privação de sono e ingestão crônica de álcool e abuso de drogas são fortes inibidores (Van Praag, 1999; Ming & Song, 2005; Schlett, 2006; Drapeau & Nora, 2008; Mouret et al., 2008; Zhao et al., 2008).

A neurogênese hipocampal adulta é poderosamente estimulada por convulsões, e como nas epilepsias essas crises convulsivas se tornam crônicas. O prognóstico da doença pode causar um grande aumento no número de neurônios recém-gerados (Benzon et al, 1997; Gray & Sundstrom, 1998; Parent & Lowenstein, 2002; Scott et al., 1998). Além do aumento das novas células, a relação entre neurogênese e epilepsia apresenta outras implicações, uma variedade de estudos sobre o assunto relata que o fenômeno poderia ser uma consequência do processo lesivo desencadeador que pode facilitar o processo epileptogênico (Dashtipour et al, 2001; Zhan, Timofeeva, & Nadler, 2010; Murphy et al., 2011; Wood et al., 2011; Hung et al., 2012).

A primeira crise convulsiva pode ocasionar um processo nomeado rebrotamento de fibras musgosas, que é um crescimento acentuado dos axônios das células granulares em decorrência da perda de seus alvos, as células musgosas, criando um circuito de autoestimulação pelas células granulares (Babb et al., 1991; Sutula et al., 2004; Pitkanen, 2010). Esse processo de rebrotamento de fibras musgosas é considerado por alguns autores como o fator desencadeante da hiperexcitabilidade dos neurônios nas epilepsias; essa possibilidade é nomeada de hipótese excitatória. A partir desse pressuposto, foram realizados vários estudos eletrofisiológicos, morfológicos, em modelos animais e humanos. Os resultados corroboraram com a hipótese, entretanto outros estudos necessitam ser feitos para elucidar essa hipótese (Cronin & Dudek, 1988; Buckmaster & Dudek, 1997; Lynch & Sutula, 2000; Wuarin & Dudek, 2011; Tauck & Nadler, 1985; Isokawa & Mello, 1991; Isokawa et al., 1991; Masukawa et al., 1992; Mathern et al., 1997).

Outra característica típica das células granulares geradas após convulsões é a sua migração para a região hilar do giro dentado (na qual ocorre a perda das células musgosas), em vez de para a camada de células granulares, que seria o seu destino padrão após a neurogênese. Essas células foram denominadas células granulares ectópicas, sendo identificadas primeiramente em modelos animais de epilepsia por Parent et al. (1997).

Murphy et al. (2011) investigaram essas “novas” células granulares geradas na epileptogênese. Os autores avaliaram as características após a crise epiléptica induzida pela pilocarpina. De acordo com seus achados, as células granulares recém-nascidas após a indução de epilepsia em modelos animais podem ser divididas em dois grupos, que diferem em sua localização final (nas camadas do GD) e excitabilidade. O primeiro grupo, que compreende a maioria dessas novas células, mostrou uma redução significativa na densidade de espinhas dendríticas (as quais aumentam o efeito excitatório), indicando uma entrada excitatória diminuída. O segundo grupo, que compreende 10% dessas novas células apresentou mais contatos sinápticos com as fibras musgosas brotadas (mais entrada de neurotransmissor excitatório), indicando, assim, um maior grau de integração em redes excitatórias.

Murphy et al. (2011) forneceram uma nova visão importante ao indicar que convulsões epilépticas poderiam induzir essas duas populações distintas de células granulares, exercendo efeitos diferenciais sobre o hipocampo dos modelos de epilepsia. Outros autores descobriram que a duração e a gravidade da convulsão inicial podem ser fatores-chave que regulam as propriedades importantes de células granulares adultas (Mohapel et al., 2004). As células granulares nascidas sob condições de convulsões severas podem ser mais propensas a se desenvolver em células hiperexcitáveis, enquanto que as células nascidas em condições de convulsão menos severas gerariam preferencialmente uma população de células granulares com diminuição do movimento excitatório (Bielefeld et al., 2014).

Um outro estudo in vivo interessante neste contexto foi apresentado por Hung et al. (2012), que mostrou uma associação entre o número de células granulares recém-nascidas (ectópicas) e a duração das convulsões iniciais em ratos tratados com pilocarpina. A ideia de que a integração de uma população específica de células recém-nascidas com diferentes propriedades na rede do hipocampo contribui para a epileptogênese é sustentada por modelos computacionais recentes (Schneider-Mizell et al., 2010).

Determinou-se também que o surgimento de células granulares ectópicas precede o início da primeira convulsão espontânea. Além disso, houve uma correlação significativa entre o número de células granulares ectópicas e a frequência de convulsões (Koyama, 2014).

Outro dado importante em relação a neurogênese é que a proliferação de novos neurônios no cérebro devido às convulsões é um processo transitório, e esse aumento da neurogênese retorna a um nível normal de 3-4 semanas após a última convulsão (Jessberger et al., 2007). Apesar dos inúmeros estudos de investigação acerca da neurogênese hipocampal na epilepsia, os mecanismos pelos quais os ataques epiléticos alteram a neurogênese adulta continuam sendo um mistério (Rolando & Taylor, 2014).

Os dados dos artigos que estudaram a relação da neurogênese hipocampal aberrante nos hipocampos de modelos animais de ELT despertam o questionamento se a mesma ocorre com os pacientes com ELT, uma vez que Koyama (2014) aponta a precedência da migração ectópica das células recém-geradas às crises epiléticas espontâneas. Ademais, Cho e colaboradores, em 2015, mostraram que a ablação (remoção) da neurogênese adulta antes das convulsões agudas induzidas por pilocarpina em camundongos levaram a uma redução na frequência de convulsões crônicas (espontâneas). O efeito da ablação da neurogênese mostrou-se duradouro, pois diminuiu a frequência das crises crônicas por quase um ano no experimento realizado. Acentuando ainda mais a importância da neurogênese aberrante para o prognóstico clínico da ELT.

Entender melhor o papel da migração diferenciada das células granulares no “hipocampo epiléptico” pode corroborar com os dados já apresentados com modelos animais e lançar novas perspectivas de estudos acerca da epileptogênese e de possíveis intervenções prévias ao processo de adoecimento.

A partir dos dados obtidos dos estudos citados sobre neurogênese hipocampal na Epilepsia do Lobo Temporal e de como o histórico da doença pode interferir nesse processo, pretendemos, no nosso estudo, investigar tais achados no hipocampo de pacientes com ELT, estudando as diferenças na camada de células granulares, a citoarquitetura dessas células e possíveis rearranjos do seu estrato. A história clínica dos pacientes será um diferencial no que tange poder ver as diferenças estruturais entre os pacientes ou similaridades de pessoas acometidas pela mesma patologia, lançando uma nova perspectiva para relacionar o prognóstico dos pacientes com a sua história pregressa.

OBJETIVOS

Geral

Correlacionar a migração ectópica das células neurogênicas dos hipocampos adultos retirados nas cirurgias aos perfis de história clínica dos pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal (ELT).

Específicos

- Descrever qualitativamente o padrão de migração neurogênica das células granulares do giro dentado dos hipocampos dos pacientes portadores de ELT;
- Descrever qualitativamente a morfologia das células granulares dos hipocampos coletados;
- Descrever as similaridades e diferenças na história clínica dos pacientes refratários ao tratamento;
- Correlacionar os dados obtidos nas histórias clínicas com os achados das marcações imunohistoquímicas dos hipocampos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Participantes

Foram selecionados pacientes portadores de 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 e não ter diagnóstico de outras patologias neurológicas.

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 na rede privada. Foi realizado o levantamento do histórico clínico realizado pelo neurocirurgião nas consultas pré-operatórias. A ficha utilizada para levantamento da história clínica nas epilepsias se encontra no ANEXO A. 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 B).

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), e também a Resolução CNS 196/96, a qual ressalta que “toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à 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, Av. Generalíssimo Deodoro, 92 – Umarizal. CEP 66055-240, Belém – PA. Recebendo o aceite favorável no dia 13/12/2017, com Certificado de Apreciação para Apresentação Ética (CAAE) número 67114317.2.0000.5172.

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 0.1M, durante 3 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 à crioproteção por imersão em soluções crescentes de sacarose 15, 20 e 30%, diluídas em Tampão Fosfato 0.1M com acréscimo de glicerina 2%. Após, o material foi cortado no criostato Leica Jung CM300 a 30 μ m, em plano coronal ao eixo rostro-caudal da formação do hipocampo. Houve a seleção de algumas lâminas para a efetuação de coloração HE (Hematoxilina-Eosina) e/ou Nissil (Bancroft, Gamble. & Suvarna), para a visualização da anatomia geral do hipocampo.

Processamento Imunohistoquímico

As secções de tecido a serem analisadas (lâminas selecionadas) com imunohistoquímica, foram previamente lavadas com água destilada (5 minutos) + PBS (Solução Tampão Fosfato) (5 minutos). Após essa etapa, foi realizada a recuperação antigênica com solução de ácido cítrico no banho maria 90° C por 20 minutos. Em sequência, foi realizada uma segunda lavagem com água destilada (5 minutos) + PBS (5 minutos). Em seguida, realizou-se a permeabilização das lâminas com solução de Saponina durante 10 minutos.

Foi efetuada uma terceira bateria de lavagem com PBS (2X) durante 5 minutos cada. Posteriormente foi realizado o bloqueio das proteínas inespecíficas com BSA (Bovine Serum Albumin) 10% (30 minutos) e a incubação com o anticorpo primário (VER TABELA 1) durante toda a noite (overnight).

No dia seguinte, realizou-se duas lavagens em PBS com 5 minutos cada. Logo após, houve a incubação em biotina, durante 30 minutos a 37° C. Foram efetuadas outras duas lavagens em PBS com 5 minutos cada e a incubação em streptavidina durante 30 minutos a 37° C. O método utilizado

foi o LSAB-Labelled Streptavidin Biotin, que consiste em usar a biotina que se liga no anticorpo primário e, em seguida, a Streptavidina conjugada a enzima que se liga à biotina, a qual é revelada com DAB (Diaminobenzidine), como descrito a seguir.

Na etapa final, foi efetuada mais duas lavagens em PBS com 5 minutos cada, seguidas pela revelação com a solução de DAB (Diaminobenzidine), o tempo de revelação variou entre 30 segundos e 2 minutos. A reação foi interrompida com uma lavagem em PBS (5 minutos). Uma contracoloração com Hematoxilina (1 minuto) foi realizada em algumas lâminas. As montagens das lâminas foram precedidas por uma desidratação (álcool 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, xilol 1 e xilol 2 - 2 minutos cada). Após, realizou-se a montagem com Permount (Fisher Scientific) e lamínulas para proteção tecidual. Todos os passos apresentados nessa seção seguiram o protocolo padrão da Seção de Patologia (SAPAT) do Instituto Evandro Chagas (IEC). Os anticorpos utilizados e sua marcação específica se encontram na tabela 1, a seguir:

Anticorpo	Fabricante	Especificações	Diluição Utilizada	Marcação
Anti-NeuN	Millipore MAB377	Monoclonal feito em Camundongo	1:10	Pericários de neurônios adultos
Anti-DCX	Santa Cruz sc8066	Policlonal feito em Cabra	1:200	Neuroblastos migratórios
Anti-GFAP	Millipore MAB360	Monoclonal feito em Camundongo	1:400	Astrócitos

Tabela 1. Dados dos anticorpos primários. A Tabela mostra o fabricante, especificações, diluição utilizada e a marcação específica de cada anticorpo.

Análise morfológica do hipocampo

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

Análise da história clínica

Foram confeccionadas tabelas dos dados gerais e clínicos dos pacientes com o software de livre acesso LibreOffice Calc versão 5.3 para análise qualitativa.

RESULTADOS

Dados gerais

Foi obtido material hipocampal nas cirurgias de epilepsia, provenientes de cinco pacientes portadores de ELT. Todos os indivíduos foram submetidos ao processo cirúrgico e tiveram um dos hipocampos resseccionados, além de regiões adjacentes que apresentavam alterações nos exames pré-operatórios (Ressonância Magnética Nuclear e de Vídeo Eletroencefalograma), características de ELT. A área resseccionada foi dividida em duas partes, sendo uma destinada a análise histopatológica (não relacionada com o presente estudo) e a restante que engloba a formação hipocampal utilizadas na análise deste trabalho.

Todos os pacientes se enquadravam dentro dos critérios de inclusão relatados anteriormente (Pág.23). Para descrição e proteção da identidade dos pacientes, cada um recebeu um código de identificação (P1, P2, P3, P4, P5) conforme a ordem cronológica das cirurgias realizadas, o qual será utilizado nas tabelas e na descrição dos resultados obtidos. A tabela 2 ilustra os dados gerais dos pacientes que realizaram a cirurgia.

Dados Gerais	P1	P2	P3	P4	P5
Idade	35	46	47	46	26
Sexo	M	M	M	F	M
Cor/Raça	Parda	Parda	Parda	Parda	Parda
Estado Civil	Solteiro	Casado	Solteiro	Solteiro	Solteiro
Escolaridade	Ens. superior incompleto	Ens. médio	Ens. médio	Ens. técnico	Ens. médio
Profissão /Ocupação	Estudante	Representante comercial	Não trabalha	Téc. em radiologia	Não trabalha

Tabela 2. Dados gerais dos pacientes. A tabela de pacientes (N=5) que realizaram cirurgia de ressecção hipocampal enfatiza e agrupa aspectos sociodemográficos dos pacientes até o momento que foram submetidos à cirurgia.

Como observado na tabela 2 a maioria dos pacientes é do sexo masculino. O paciente P5 foi o paciente mais novo, com 26 anos de idade, e a idade máxima foi de 47 anos de idade (P3). Todos os pacientes se declararam ser de cor parda e ter o ensino médio como escolaridade mínima. A maioria dos pacientes é solteiro e relatam desempenhar um trabalho/ocupação. A Tabela 3, a seguir, mostra a história clínica dos pacientes.

História Clínica	P1	P2	P3	P4	P5
Evento precipitante	3 meses- Crise febril	2 anos- Pancada na cabeça seguida de convulsão	NC	NC	1 ano- Crise febril seguida de desmaio por 4 horas
Período de latência (entre o evento precipitante e a primeira crise)	Cerca de 6 meses	4 anos	NC	NC	21 anos
Idade da primeira crise	Antes de 1 ano de vida	6 anos	7 anos	Antes dos 5 anos	22 anos
Frequência de crises antes da cirurgia	4/mês	4/semana	3-4 / dia	10/mês	2-3/semana
Esquema terapêutico na ocasião da cirurgia	Lamotrigina 200mg, clobazam 40mg e fenitoína 400mg/dia	Ácido Valproico 1250mg, fenobarbital 150mg e Carbamazepina 2mg/dia	Oxcarbazepina 1200mg, lamotrigina 200mg e clobazam 20mg/dia	Oxcarbazepina 1200mg	Carbamazepina 400mg, valproato 1000 mg e clobazam 10mg/ dia

Tabela 3. História clínica dos pacientes. A tabela mostra os dados obtidos espontaneamente durante atendimento ambulatorial, enfatizando as diferenças encontradas em 4 fatores clínicos nos 5 pacientes. A sigla NC nos pacientes P3 e P4 significa dados não coletados.

A Tabela 3 mostra que os dados obtidos dos pacientes em relação aos eventos precipitantes, ou seja, o evento anterior à primeira crise espontânea, aconteceram antes dos cinco anos de idade. A primeira crise epiléptica (não ocasionada por fatores externos) ocorreu, em sua maioria, na infância dos pacientes, todavia, o paciente P5 relatou ter começado a ter as crises já na idade adulta.

Todos os pacientes apresentaram pelo menos 4 crises por mês, sendo que o esquema terapêutico de cada paciente não foi homogêneo, apresentando um uso de altas dosagens e interações medicamentosas.

Dados Anatômicos do hipocampo de pacientes portadores de ELT

O complexo hipocampal, como descrito na introdução, é subdividido em áreas, a saber: CA1, CA2, CA3, giro dentado, subiculum, presubiculum, parasubiculum e o córtex entorrinal. Na fração de tecido extraída para utilização no presente estudo, conseguimos observar, após a análise morfológica com métodos clássicos, com a coloração de Nissl e/ou coloração de HE, as principais estruturas da formação hipocampal (CA1, CA2, CA3, giro dentado) (Dados não mostrados). Entretanto, os resultados descritos abaixo foram concentrados no Giro Dentado (GD), por ser a região neurogênica. A área do giro dentado é determinada nas secções da amostra por sua conformação característica em formato de “dente” e pela conformação anatômica de suas células características, as células granulares, tendo o “corpo” em forma elíptica, com um formato cônico característico (Andersen, 2006).

A análise imunohistoquímica realizada no GD de todos os espécimes revelou que somente a imunoreatividade para anti-DCX foi negativa nas amostras de P1, P2 e P3. As marcações para Anti-NeuN e Anti-GFAP, por outro lado, apresentaram o mesmo padrão de marcação positiva. Como descrita na tabela 4, a seguir.

Anticorpo	P1	P2	P3	P4	P5
Anti-NeuN	✓	✓	✓	✓	✓
Anti-DCX	x	x	x	✓	✓
Anti-GFAP	✓	✓	✓	✓	✓

Tabela 4. Relação da imunorreatividade dos anticorpos usados em cada amostra. Legenda: (✓) Marcação positiva ; (x) Marcação não obtida ou não visualizada.

Padrão de marcação imunohistoquímica para NeuN

A imunomarcação positiva para células NeuN foi observada em toda a extensão do tecido, entretanto o GD foi reconhecido pela arquitetura específica que o mesmo apresenta, como ilustrado na Figura 4.

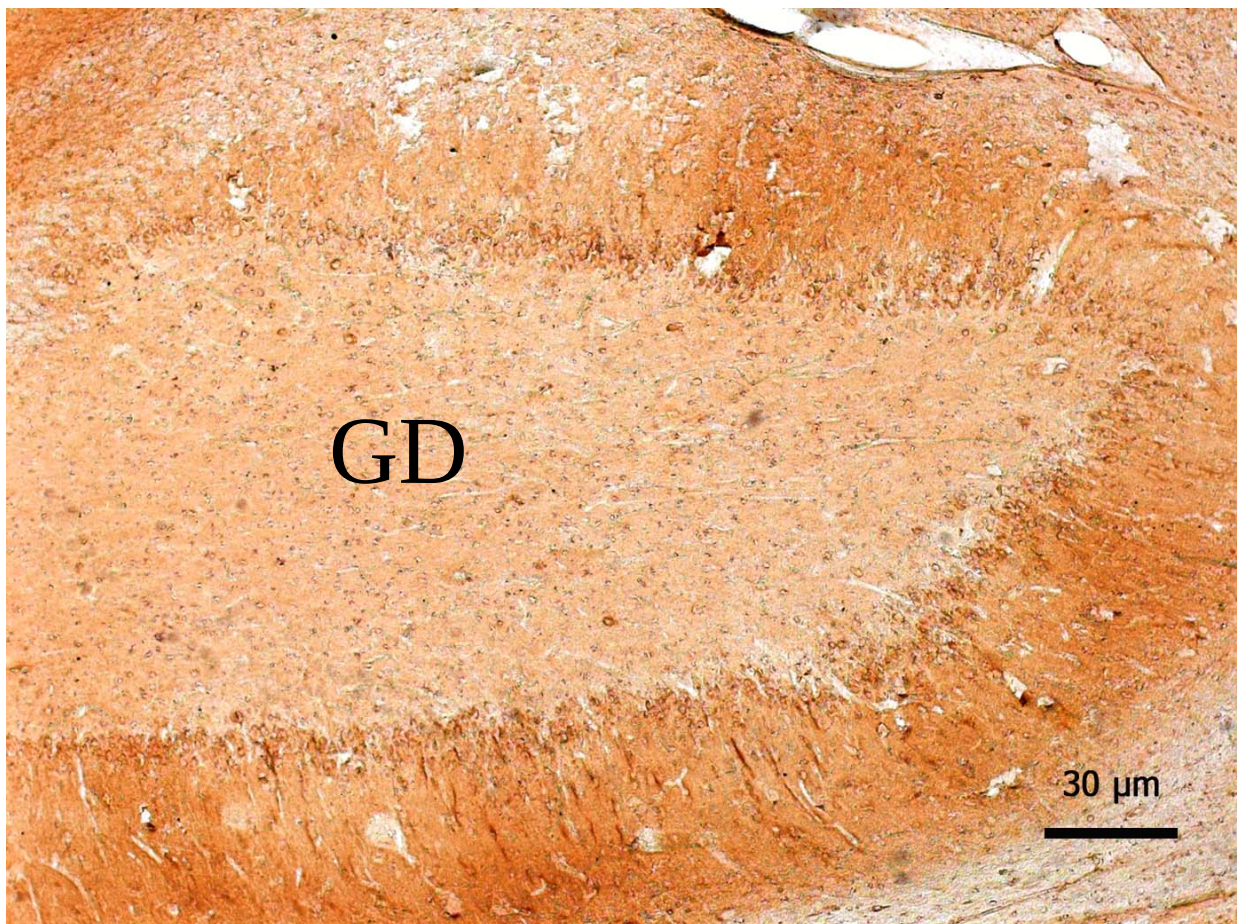


Figura 4. Fotomicrografia da área do GD do Hipocampo da amostra coleta dos pacientes portadores de ELT com marcação positiva para Anti-NeuN. Seção da região hipocampal em baixo aumento do paciente P4, ilustrando a imunomarcação positiva para Anti-NeuN abrangendo toda a extensão do giro dentado (GD). Escala = 30 um.

A figura 5, a seguir, ilustra uma fração da imagem descrita na figura 4 em maior aumento para demonstrar que marcação de Anti-NeuN foi positiva para as células granulares no GD (seta).

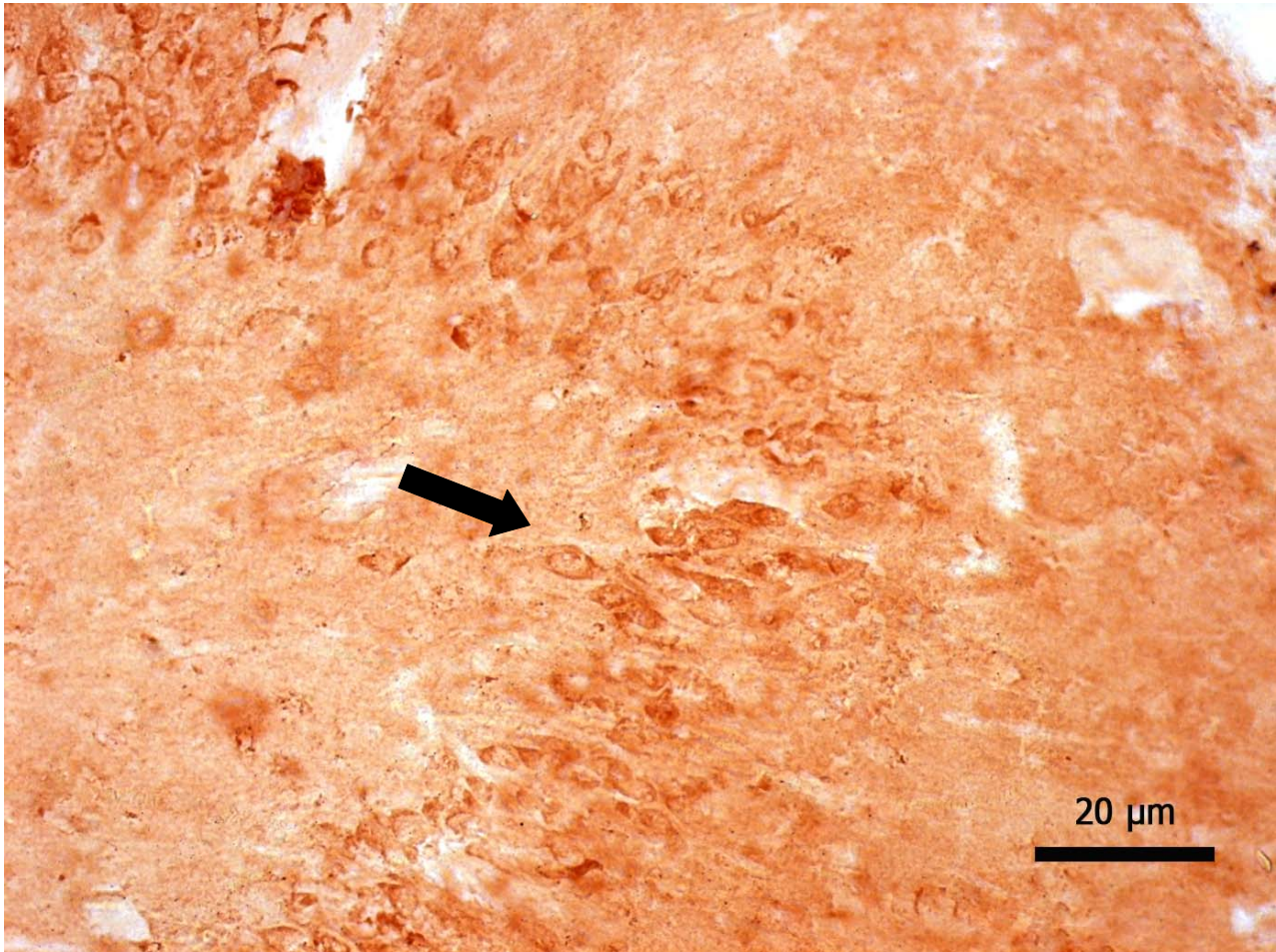


Figura 5. Fotomicrografia em Maior Aumento do Giro Dentado da Amostra Coletada dos Pacientes Portadores de ELT com Marcação Positiva para Anti-NeuN. A qual foi obtida com objetiva 20X da região mais angulada do GD com marcação positiva para Anti-NeuN (seta). Escala=20μ m.

Na figura 5 podemos observar uma megalia, ou seja, um aumento no diâmetro dos corpos celulares dos neurônios maduros, além de uma dispersão de células granulares. Esses achados podem ser observadas com mais clareza na Figura 6.

A figura 6 ilustra uma fotocomposição (6A e 6B) formada por uma fotomicrografia obtida através do site de patologia da Unicamp (anatpat.unicamp.br/bineuhipocamponl1fb.html) de um hipocampo controle e feita com a técnica clássica de Hematoxilina-Eosina (figura 6A) e a fotomicrografia em grande aumento dos achados com a marcação de Anti-NeuN (figura 6B).

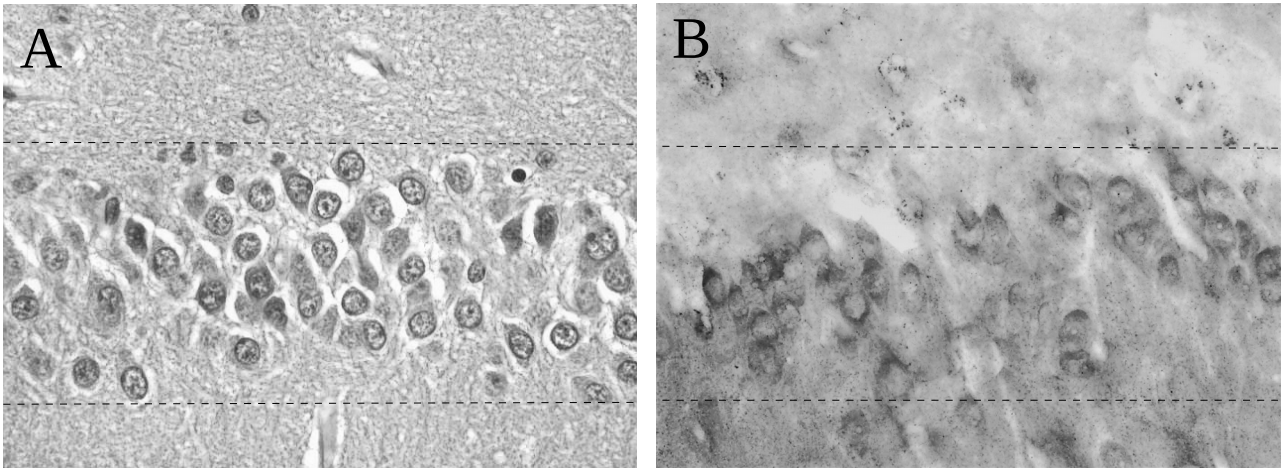


Figura 6. Fotocomposição de achados Histopatológicos no GD em Indivíduos Controle e na Imunomarcção para NeuN nas Amostras Coletadas. A figura 6A ilustra a lâmina do GD de um indivíduo controle obtido do site de patologia da Unicamp com a coloração de HE. A figura 6B mostra a região equivalente dos pacientes portadores de ELT marcados com NeuN (paciente P4). As linhas pontilhadas ilustradas na figura delimitam a extensão da camada de células granulares.

A figura 6A apresenta um padrão de alta densidade e agregação celular, com uma regularidade de espaçamento entre as células granulares, as quais formam uma camada nitidamente delimitada (linha tracejada). A figura 6B, por sua vez, apresenta uma dispersão e rarefação de células granulares. Apesar dos diferentes tipos de metodologia, nota-se uma diferença significativa entre a marcação obtida na figura 6A e na figura 6B. Esse padrão de dispersão visualizado na fotomicrografia 6B pode ser observado em toda a extensão do Giro Dentado das amostras hipocâmpais (com áreas mais densas e menos densas de células) do presente estudo com marcação para NeuN.

Padrão de marcação imunohistoquímica para DCX

As células com imunomarcção para DCX foram visualizadas nas amostras provenientes dos pacientes P4 e P5, obtendo uma marcação positiva na camada do GD. O padrão obtido na marcação com o anticorpo Anti-DCX pode ser visualizado na Figura 7.

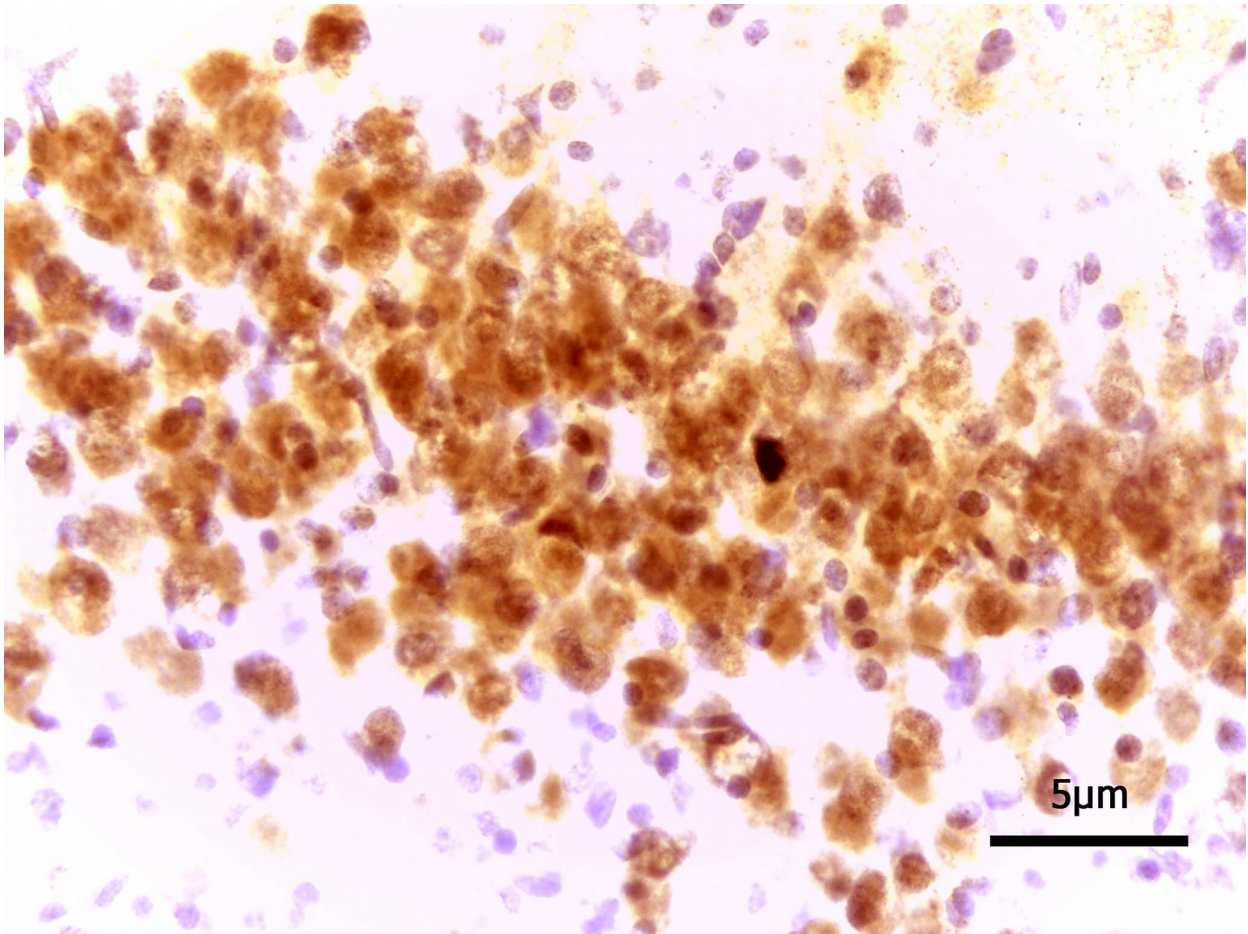


Figura 7. Fotomicrografia em maior aumento (40X) do GD da Amostra Coletada dos Pacientes Portadores de ELT com Marcação Positiva para Anti-DCX. Na figura 7 realizou-se simultaneamente a marcação com Hematoxilina para evidenciar a totalidade dos corpos celulares presentes (corpos celulares azuis). As células marrons correspondem as marcadas positivamente por anti-DCX. Escala=5µm.

A figura 7 apresenta um padrão diferente da marcação para o anticorpo Anti-NeuN, as células granulares DCX positivas apresentaram uma maior densidade celular. Todavia, a dispersão encontrada nas células com marcação para NeuN (Figura 6B) também foi encontrada nas células granulares DCX positivas.

Padrão de marcação imunohistoquímica para GFAP

A marcação positiva para astrócitos apresenta um padrão diferente dos descritos anteriormente. O anticorpo GFAP gera uma visualização de toda a extensão dos astrócitos (corpo celular, dendritos e axônios). Na região do Giro dentado o padrão de marcação para GFAP foi o visualizado na Figura 8.

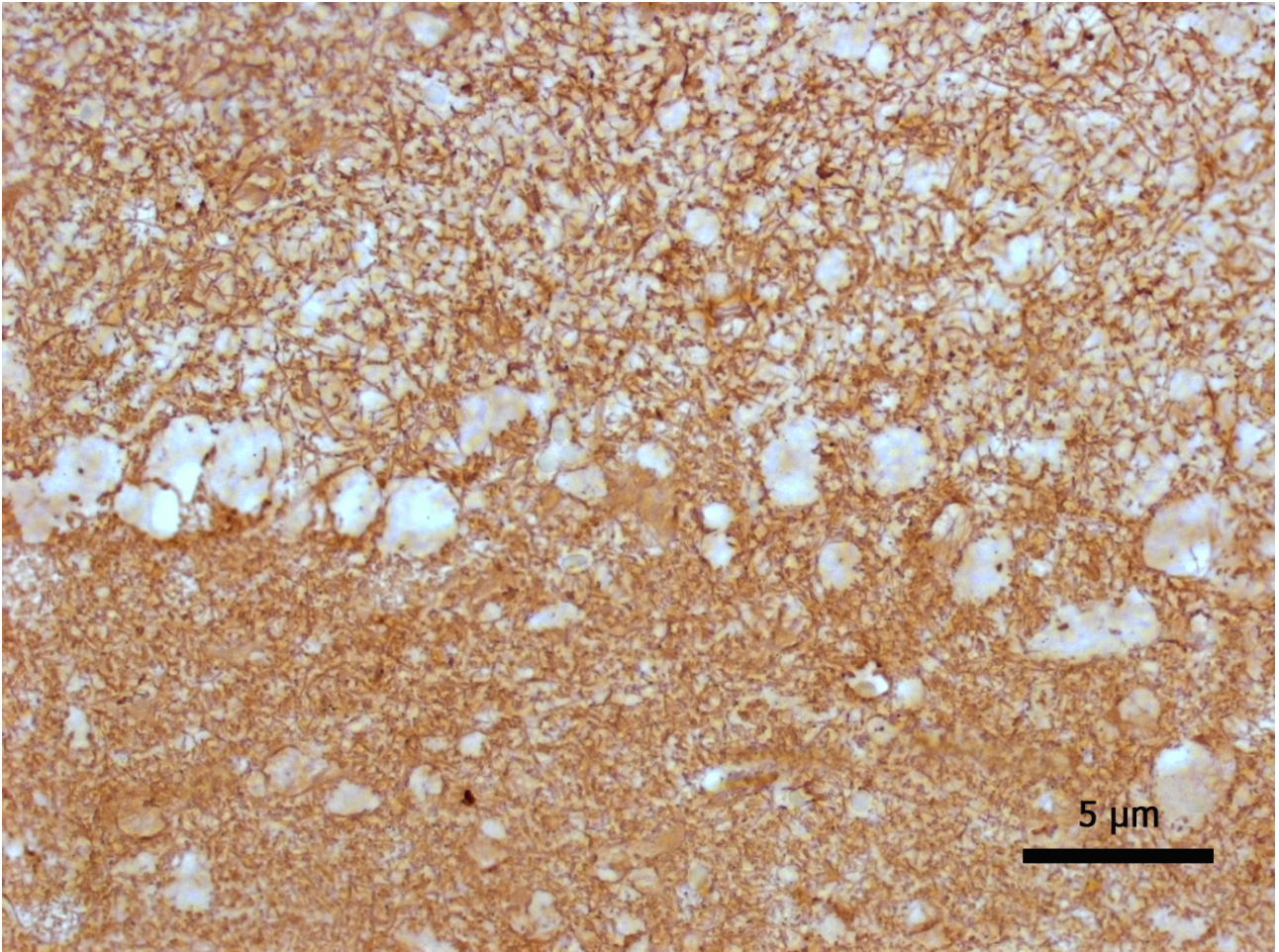


Figura 8. Fotomicrografia em maior aumento (40X) do GD da amostra coletada dos pacientes portadores de ELT com marcação positiva para Anti-GFAP. A figura mostra a marcação positiva para astrócitos, em grande aumento na região do GD. os perfis marcados em marrom, mostram os dendritos e axônios dos astrócitos, que preenche toda a extensão do GD. Escala= 5µm.

A marcação das células astrocitárias não é vista como um todo no Giro Dentado dos pacientes, vemos em sua maioria, apenas as ramificações dessas células gliais. As ramificações formam uma espécie de rede e seus intervalos são semelhantes a forma cônica característica das células granulares.

Outras áreas do hipocampo também obtiveram marcação positiva para anti-GFAP, entretanto nessas outras áreas houve a visualização de corpos celulares de astrócitos. As setas na Fig 9 ilustram células astrocitárias marcadas em áreas adjacentes ao Giro Dentado.

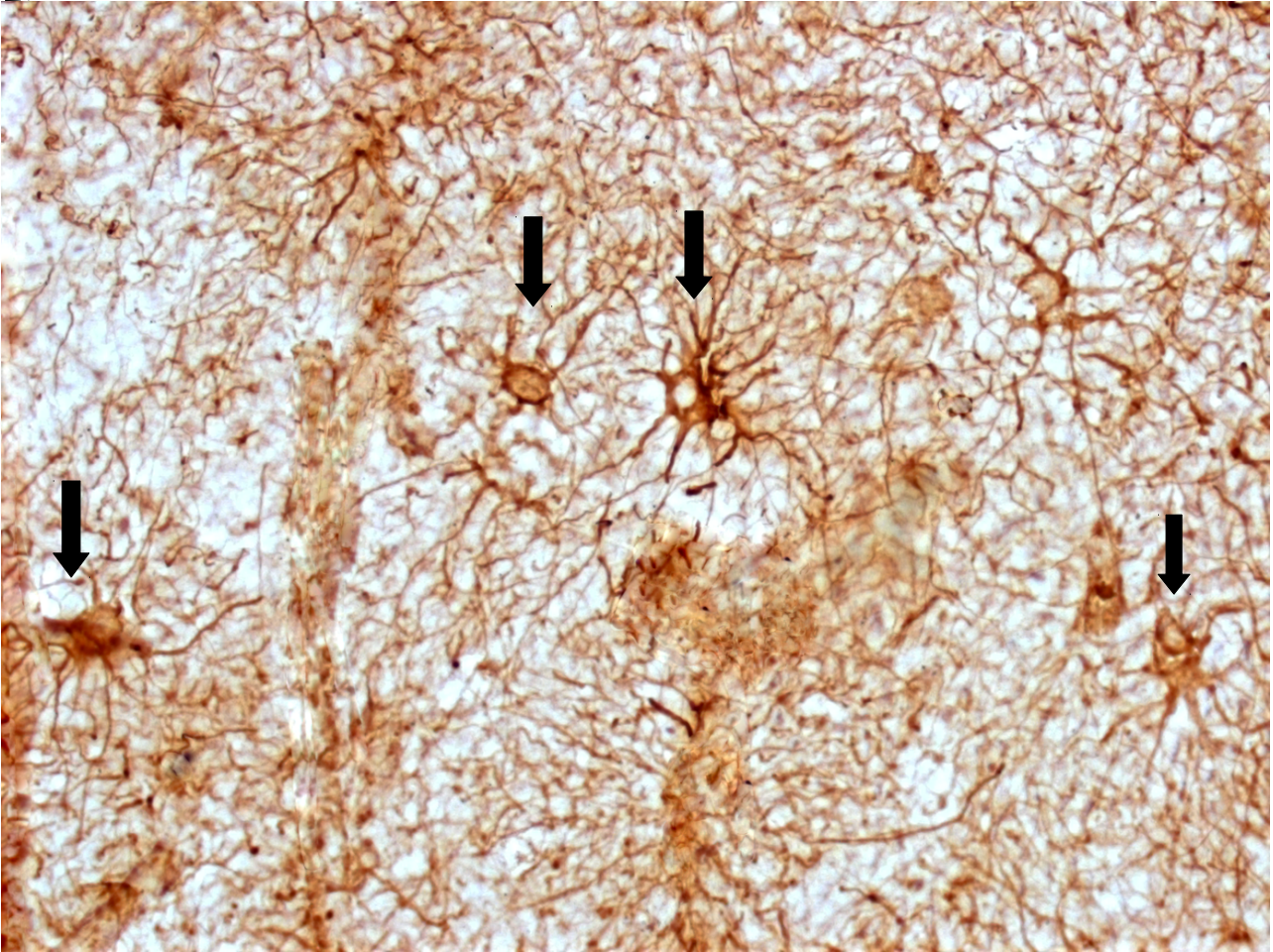


Figura 9. Fotomicrografia em maior aumento de áreas adjacentes ao GD da amostra coletada dos pacientes portadores de ELT com marcação positiva para Anti-GFAP. Marcação de GFAP positiva em astrócitos de áreas adjacentes ao DG, ilustram células astrocíticas (setas) em formato de estrela, característico desse tipo celular. Escala= 5 um.

A figura 9 mostra uma marcação acentuada para GFAP com várias ramificações e corpos celulares bem delimitados (setas), rede densa configurando uma ativação maciça das células astrocíticas, as quais não foram visualizados no Giro Dentado apresentado na figura 8.

Plano geral da marcação imunohistoquímica

A figura 10 reúne o conjunto das imunomarcações realizadas, comparando-as ao diagrama esquemático das camadas do GD (Figura 10A) de modo a termos um padrão geral de marcação, ressaltando suas diferenças e similaridades encontradas no GD de pacientes portadores de ELT. É possível através da análise comparativa das imagens observar que ocorre uma dispersão celular nas marcações realizadas por Anti-NeuN (Figura 10B) e Anti-DCX (Figura 10C). A figura 10D que

marca os prolongamentos astrocitários, não remete especificamente a esse padrão de dispersão, uma vez que o mesmo não marca as células alvo, entretanto pode ser visto a rede densa dos prolongamentos de astrócitos na área do GD.

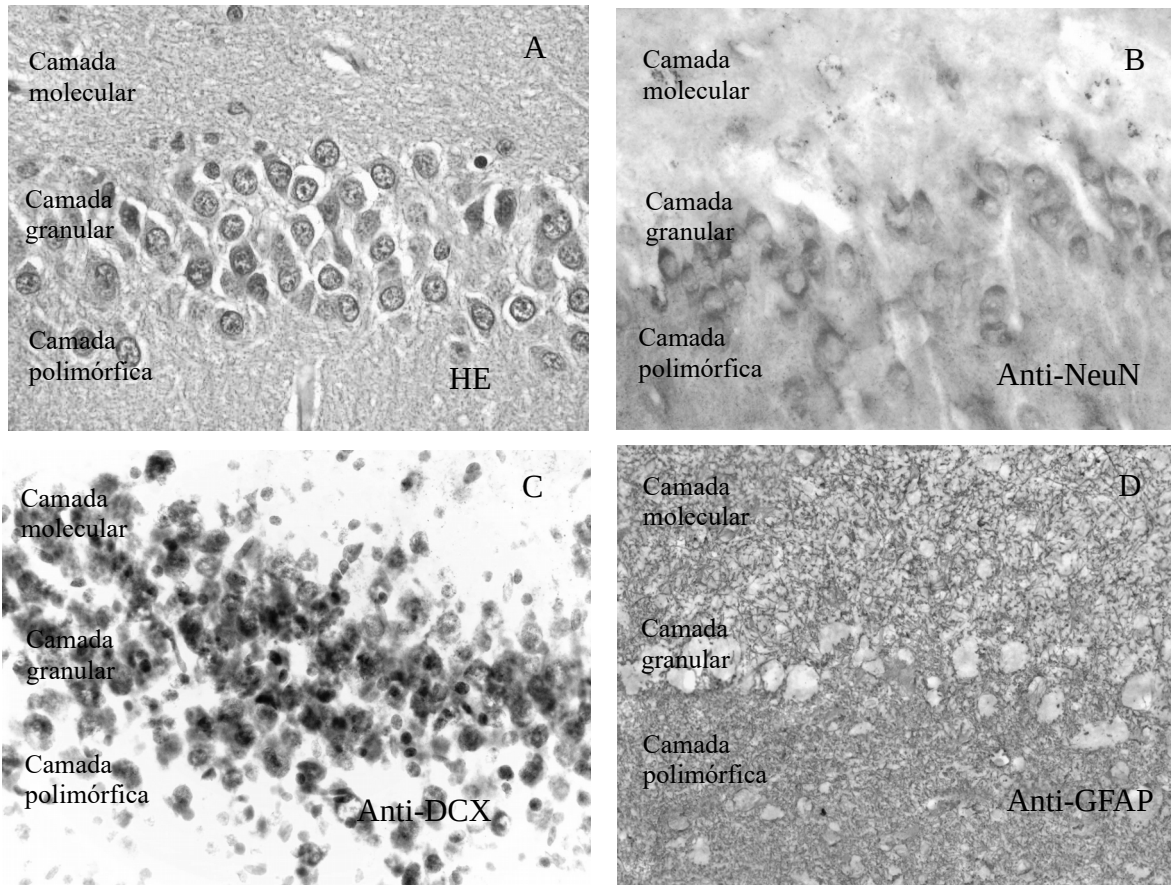


Figura 10. Fotocomposição contendo um diagrama esquemático com o GD de um indivíduo controle obtido do site de patologia da Unicamp com a coloração de HE (Figura 10A), padrão obtido para marcação de Anti-NeuN (Figura 10B), padrão obtido para marcação de Anti-DCX (Figura 10C) e o padrão obtido de marcação para células Gliais marcados por Anti-GFAP (Figura 10D) utilizados no presente estudo nas camadas do GD.

A figura 10 mostra as diferenças nas marcações, principalmente a marcação Anti-DCX positiva, que exibe uma marcação proeminente de corpos celulares (neuroblastos), enquanto a marcação Anti-NeuN positiva (neurônios maduros) apresenta uma marcação menos abundante de corpos celulares. A marcação para GFAP é restrita a fibras das células astrocitárias no GD.

Além das diferenças entre os padrões de marcação obtidos no presente estudo, nota-se uma diferença significativa entre a Figura 10A e as demais, principalmente em relação ao padrão de disposição das células granulares.

DISCUSSÃO

História clínica dos pacientes

Os resultados apresentados nas tabelas 1 e 2 mostraram muitos aspectos interessantes que precisam ser discutidos. Mesmo com uma amostra ainda reduzida de pacientes (N=5), podemos evidenciar alguns aspectos que merecem menção: a variação de idade entre os pacientes foi de 21 anos, o que mostrou que utilizamos um largo espectro de idades (menor = 26 anos e maior = 47 anos) e que sugere que a cronicidade da doença não parece ter nenhuma relação com a idade. Em relação aos dados de cor/raça e gênero, houve uma unanimidade entre os pacientes ao se declararem de cor parda e a maioria dos pacientes era do sexo masculino.

Em relação a cor/raça, estudos indicam relações entre os tipos diferentes de epilepsia, contudo não há resultados contundentes que apontem uma associação entre essa variável e a epilepsia de forma geral (Friedman & Fahlstrom, 2013). A relação da incidência de epilepsia e gênero, assim como a variável anterior, apresenta estudos que a relaciona com diferentes tipos de epilepsia. Os resultados dessas investigações sugerem uma suscetibilidade de gênero ao desenvolvimento de subtipos específicos de epilepsia. No geral, não houve diferença entre os sexos na epilepsia relacionada à localização, mas as epilepsias sintomáticas relacionadas à localização foram mais frequentes nos homens, e as epilepsias criptogênicas relacionadas à localização foram mais frequentes nas mulheres (Christensen et al., 2005; Janszky, Schulz, Janszky & Ebner, 2004).

O estado civil também foi outro dado levantado em nossa amostra, e a maioria dos pacientes (N = 4) se declarou solteiro, o que pode estar ligado ao isolamento social que acomete os pacientes. Este fato, porém, teria que ser abordado de maneira mais aprofundada em estudos futuros sobre a epidemiologia de pacientes com ELT.

Todos os participantes obtiveram no mínimo o ensino médio como escolaridade, sendo que a maioria exercia uma profissão, entretanto dois pacientes (P3 e P5) relataram não exercer funções laborais com receio de ter uma crise epiléptica durante as atividades de trabalho (sic.). Esses dados

são importantes, uma vez que estudos apontam que uma parte significativa da comunidade com epilepsia relatou que o estigma que a doença acarreta é mais difícil de ser enfrentado do que as sintomatologias apresentadas (Elliot, 2009; Boer, Mula & Sander, 2008; Viteva, 2013).

Os dados da tabela 2 de história clínica mostraram um fato interessante sobre o evento precipitante: a maioria dos pacientes apresentaram esse episódio antes dos cinco anos de idade, época do desenvolvimento infantil conhecida como primeira infância. Esse momento do desenvolvimento é apontado como um período crítico para a plasticidade neural (Hubener & Bonhoeffer, 2014). Os pacientes, em sua maioria, apresentaram a primeira crise ainda na infância, com um período de latência entre o evento precipitante e o evento espontâneo. Esse intervalo é apontado como o tempo de desenvolvimento da epilepsia, nomeado epileptogênese, no qual acontecem as transformações necessárias para a geração de crises espontâneas e possíveis remodelagens neurais.

A frequência das crises mostrou uma taxa alta entre os pacientes do estudo, com no mínimo 4 crises/mês, e em alguns casos (P3) apresentando mais de 3 crises por dia. Essa alta frequência de crises mostra os possíveis problemas sociais enfrentados pelos participantes uma vez que em um mesmo dia o paciente pode apresentar várias crises inesperadas, e isso pode afetar a qualidade de vida do mesmo.

A combinação de vários fármacos em alta dosagem indica um dos indícios de refratariedade da doença. Os pacientes que não respondem ao medicamento antiepiléptico inicial apresentam uma diminuição da probabilidade de reposta proporcional com o número de fármacos testados sem sucesso (Moshé, Perucca, Ryvlin & Tomson, 2015). Em um ponto de vista teórico, para que um paciente portador de epilepsia seja considerado refratário ao tratamento medicamentoso o mesmo não pode obter o controle das crises epiléticas com nenhuma das drogas epiléticas disponíveis, usadas isoladamente ou em combinação, até doses ou níveis subtóxicos (Garzon, 2002).

A obtenção de dados sobre a história do processo de adoecimento do paciente é essencial para o entendimento da doença em si, uma vez que a epilepsia atinge pessoas de todos os sexos e todas as idades, de variados estratos sociais. É também importante buscar novas maneiras de se entender esses pacientes de forma holística, buscando integrar o seu biopsicossocial para uma melhor discussão do processo de adoecimento.

Padrão de Marcação Imunohistoquímica

Pela primeira vez, tivemos a oportunidade de utilizar hipocampos de pacientes portadores de ELT, guardando as referências anatômicas das principais regiões hipocampais. O método adotado nesse trabalho foi baseado na retirada em bloco do hipocampo, e sua fixação em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1M realizado ainda dentro do Centro Cirúrgico. A expertise do neurocirurgião, alinhado com as necessidades do experimentador de preservar as referências anatômicas, ajudou no êxito dos resultados imunohistoquímicos. Obtivemos o tecido neural de maneira rápida e muito bem preservado.

Aliado a esse fato descrito acima, a parceria institucional com a Seção de Patologia do Instituto Evandro Chagas e a Universidade Federal do Pará nos possibilitou investigar quais os tipos celulares podem estar alterados na ELT através da imunohistoquímica com anticorpos policlonais e monoclonais específicos para neuroblastos (anti-DCX), neurônios maduros (anti-NeuN) e células gliais astrocitárias (anti-GFAP). Essa parceria possibilitou a investigação de ocorrência de possíveis fenômenos celulares alterados nos hipocampos retirados de pacientes com ELT.

A marcação do anticorpo Anti-NeuN teve como objetivo verificar a dispersão da camada de células granulares e/ou migração ectópica. Nossos resultados, descritos na Figura 4, demonstraram que a visualização das células granulares, em maior aumento (objetivas de 20X e 40X) mostrou uma camada de células granulares desordenadas e com alterações de formato das consideradas

“normais”. Essas diferenças encontradas podem estar relacionadas a dispersão de células granulares, que se apresenta na Figura 6B e ausente nos indivíduos controle da Figura 6A com laminação característica e organização laminar evidente.

A dispersão das células granulares é associada na literatura à perda das células musgosas, uma vez que essas células são os alvos sinápticos das células granulares (Houser, 1990). O conhecimento sobre os mecanismos patogênicos e a interpretação do significado clínico dessa dispersão é limitado ou inexistente. Acredita-se que convulsões que ocorrem previamente nos hipocampos em fase de desenvolvimento poderiam levar ao aparecimento dessa dispersão ou até uma possível neurogênese ectópica. A associação entre os dados encontrados de dispersão de células granulares e seus respectivos dados clínicos também permanece controversa (Lurton et al, 1998; Thom et al, 2005; Rolando & Taylor, 2014).

Os resultados apresentados nesse estudo estão em consonância com os dados da literatura, uma vez que todos os pacientes desse trabalho também apresentaram o evento precipitante com uma idade reduzida. Além disso, em todos os hipocampos analisados em que o GD pode ser visualizado verificou-se o mesmo padrão qualitativo que mostra uma dispersão da camada de células granulares e suporta a hipótese de haver alguma relação direta entre essas variáveis.

A migração ectópica das células granulares foi mais amplamente investigada quando realizamos imunohistoquímica para identificar as células proliferantes através da marcação com anti-DCX. As células DCX-positivas também apresentaram uma associação com a perda das células granulares e com o evento precipitante, tal como descritos em modelos animais (Parent et al.,1997; Murphy et al., 2011). O que fortalece os nossos achados como pioneiros em humanos.

Outro dado morfológico interessante foi que algumas células granulares apresentaram um aparente formato maior que o esperado, com uma marcação fina nas bordas e um núcleo megálico.

Esse padrão celular se assemelha bastante ao padrão de “Balloon Cells”, as quais são características da displasia focal e são correlacionadas com a refratariedade medicamentosa na epilepsia (Urbach et al, 2002; Oh et al, 2008; Blümck et al, 2011).

Os achados da marcação com o anticorpo Anti-DCX também forneceram dados interessantes com relação a neurogênese. O anticorpo Anti-DCX marcou neuroblastos migratórios, que são neurônios imaturos, precursores das células adultas marcadas com NeuN (Encinas & Sierra, 2012). Os neuroblastos são células recém-geradas na neurogênese, o que mostra que, apesar da idade avançada dos pacientes e da cronicidade da doença, os pacientes apresentaram uma taxa alta de neurogênese. Essa neurogênese aumentada em pacientes crônicos de ELT entra em uma discussão controversa da literatura. Estudos utilizando marcadores para proliferação celular ou neurogênese deram resultados conflitantes: Blümcke et al. (2001) e Mathern et al. (2002) não encontraram expressão aumentada de nestina, Ki-67 ou PSA-NCAM no hipocampo de pacientes com ELT acima de 2 anos de idade. Outros estudos, porém, relataram um aumento no número de células precursoras proliferativas e neuronais, coincidindo com um aumento da dispersão de células granulares (Crespel et al., 2005; Thom et al., 2005).

Nossos resultados apresentaram-se semelhantes aos grupos de estudos anteriores que encontraram marcação para células proliferativas em hipocampos de indivíduos com ELT. Isto pode ser visualizado na figura 10C, que apresentou a marcação de Anti-DCX, e os neuroblastos migratórios foram vistos em quase toda a extensão da foto, inclusive na camada polimórfica ou hilo, o que indica uma possível migração diferenciada, ou seja, ectópica a camada de células granulares, que deveria ser o local de destino dessas novas células (Seri et al., 2004).

Os dados quantitativos nesse trabalho poderão auxiliar na verificação de uma possível diferença entre a marcação de Anti-DCX e Anti-NeuN, e somar para a elucidação da funcionalidade das células granulares recém-geradas, a qual ainda é desconhecida. Os estudos de Scharfman e

colaboradores (2000) sugerem que essas células contribuem para a excitação das células piramidais de CA3 e, conseqüentemente, aumentariam a excitabilidade no hipocampo.

A marcação com anti-GFAP só reforçou os dados encontrados, uma vez que no processo histopatológico da doença um dos achados anatômicos clássicos na esclerose hipocampal na ELT é a gliose (Nishio et al, 2000; Park et al, 2003). A gliose reativa é geralmente caracterizada por proliferação e hipertrofia de corpos celulares gliais que expressam aumento substancial nos níveis de proteína ácida fibrilar glial (do inglês glial fibrillary acid protein, GFAP). O aumento na expressão de GFAP é considerado um índice bioquímico da transformação de células gliais normais em células gliais reativas (Torre, Lothman & Steward. 1993).

O interesse pelo papel das células gliais na epilepsia teve um crescimento nas últimas décadas. Houve uma crescente afastamento de um foco “neurocêntrico”, ou seja, houve um aumento nas investigações sobre a participação das células gliais na causa das convulsões. Existe uma multiplicidade de funções associadas a célula glial astrocitária, além do papel clássico como célula de suporte (Steinhäuser, Seifert & Bedner, 2012; Sofroniew & Vinters, 2010). Nossos resultados mostraram uma forte marcação astrocitária, a qual é representada por muitas ramificações na área do GD (Figura 8) e por grandes corpos celulares marcados em áreas adjacentes (Figura 9), o que corrobora essa hipótese.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O trabalho buscou contribuir com os conhecimentos acerca das relações entre a neurogênese ectópica e a Epilepsia do Lobo Temporal, buscando uma nova visão ao se analisar a relação dessa neurogênese aberrante com a história do percurso da doença e prognóstico, encontrados na história clínica do paciente. Apesar de serem achados preliminares e ter sido obtido um reduzido número de pacientes (N=5), acreditamos que o presente trabalho tem relevância no sentido de aprofundar o

conhecimento integrado entre os fatores neurais subjacentes a epileptogênese e o prognóstico dos portadores de Epilepsia do Lobo Temporal.

Em conclusão, nossa pesquisa corroborou com os achados em modelos animais e propõe uma nova perspectiva de estudo acerca da ELT, a qual pode ajudar a entender mais efetivamente os fatores relacionados à epileptogênese na história clínica dos pacientes portadores de Epilepsia do Lobo Temporal.

REFERÊNCIAS

- Adelöw, C., Andersson, T., Ahlbom, A. & Tomson, T. (2012). Hospitalization for Psychiatric Disorders Before and After Onset of Unprovoked Seizures/Epilepsy. *Neurology*. 78(6)396-401.
- Altman, J., Das G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*. 124(3):319–335.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and Histological Studies of Postnatal Neurogenesis. Iv. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*. 137(4):433–457.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss & T., O'keefe J. *The hippocampus book*. Copyright © 2007 by oxford university press, inc.
- Babb, T.L., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Crandall, P.H. & Levesque, M.F. (1991). Synaptic Reorganization by Mossy Fibers in Human Epileptic Fascia Dentata. *Neuroscience*. 42(2):351-63.1991;42(2):351-63.
- Bakker, A., Kirwan, C.B, Miller, M. & Stark C.E. (2008). Pattern separation in the human hippocampal ca3 and dentate gyrus. *Science*. 319(5870):1640-2.
- Bancroft, J.D., Gamble, M. & Suvarna, S.K., (2012). *Theory and Practice of Histological Techniques*.7a., Elsevier Churchill Livingstone.
- Bate, L. & Gardner, M. (1999). Genetics of inherited epilepsies. *Epileptic Disorders*. 1(1):7-19.

- Bengzon, J., Kokaia, Z., Elmer, E., Nanobashvili, A., Kokaia, M. & Lindvall, O. (1997). Apoptosis and Proliferation of Dentate Gyrus Neurons After Single and Intermittent Limbic Seizures. *Proceedings of the National Academy of Sciences. Usa*, 94, 10432–10437.
- Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M. S., Steier, P., Kutschera, W., Johnson, L., Landén, M., Druid, H., Spalding, K.L. & Frisén, J. (2012). The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron*, 74, 634–639.
- Bielefeld, P., Vliet, E. A., Gorter, J. A., Lucassen, P. J. & Fitzsimons, C. P. (2014), Different Subsets of Newborn Granule Cells: A Possible Role in Epileptogenesis?. *European Journal of Neuroscience*. 39: 1-11.
- Bir, S.C.L., Ambekar, S., Kukreja, S. & Nanda, A. (2015). Julius Caesar Arantius (giulio cesare aranzi, 1530-1589) and the Hippocampus of the Human Brain: History Behind the Discovery. *Journal of Neurosurgery*. 122(4):971-5.
- de Boer, H.M., Mula, M. & Sander, J.W. (2008). The Global Burden and Stigma of Epilepsy. *Epilepsy Behavior*. 12(4):540-6. Epub.
- Buckmaster, P.S.L. & Dudek, F.E. (1997) Neuron Loss, Granule Cell Axon Reorganization, and Functional Changes in the Dentate Gyrus of Epileptic Kainate-Treated Rats. *Journal of Comparative Neurology*. 385(3):385-404.

- Blümcke, I., Schewe, J., Normann, S., Brüstle, O., Schramm, J., Elger, C. E. & Wiestler, O. D. (2001), Increase of Nestin-Immunoreactive Neural Precursor Cells in the Dentate Gyrus of Pediatric Patients With Early-Onset temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, 11: 311-321.
- Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, D. D., Vinters, H. V., Palmini, A., ... Spreafico, R. (2011). The Clinico-Pathological Spectrum of Focal Cortical Dysplasias: a Consensus Classification Proposed by an *ad hoc* Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia*, 52(1), 158–174.
- Bouchet, C. & Cazauvieilh, M. (1825). De L'épilepsie Considerée dans ses Rapports Avec L'alienation Mentale. Recherche Sur la Nature et le Siege de Ces Deux Maladies. *Archives Générales de Médecine*. 9:510–542.
- Brodie, M. J., Barry, S. J. E., Bamagous, G. A., Norrie, J. D., & Kwan, P. (2012). Patterns of Treatment Response in Newly Diagnosed Epilepsy. *Neurology*. 78(20), 1548–1554.
- Cajal, R. (1913). Degeneration and regeneration of the nervous system.
- Christensen, J., Kjeldsen, M. J., Andersen, H., Friis, M. L. & Sidenius, P. (2005), Gender Differences in Epilepsy. *Epilepsia*, 46: 956-960.
- Colucci-d'amato, L., Bonavita, V. & Di Porzio, U. (2006). The End of the Central Dogma of Neurobiology: Stem Cells and Neurogenesis in Adult CNS. *Neurological Sciences*. 27(4):266–270.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy.

(1989). Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes. *Epilepsy*.30:389-99.

Crespel, A., Rigau, V., Coubes, P., Rousset, M.C., de Bock, F., Okano, H., Baldy-Moulinier, M., Bockaert, J. & Lerner-Natoli, M. (2005). Increased Number of Neural Progenitors in Human Temporal Lobe Epilepsy. *Neurobiology Disease*. 19(3):436-50.

Cronin, J.L. & Dudek, F.E. (1988). Chronic Seizures and Collateral Sprouting of Dentate Mossy Fibers After Kainic Acid Treatment in Rats. *Brain Research*. 474(1):181-4.

Dashtipour, K., Tran, P.H., Okazaki, M.M., Nadler, J.V. & Ribak, C.E. (2001). Ultrastructural Features and Synaptic Connections of Hilar Ectopic Granule Cells in the Rat Dentate Gyrus are Different From Those of Granule Cells in the Granule Cell Layer. *Brain Research*. 890, 261–271.

Danesi, M.A. (1985). Classification of the epilepsies: an investigation of 945 patients in a developing country. *Epilepsy*. 26: 131-6.

Danilov, A. I., Gomes-Leal, W., Ahlenius, H., Kokaia, Z., Carlemalm, E. & Lindvall, O. (2009). Ultrastructural and Antigenic Properties of Neural Stem Cells and their Progeny in Adult Rat Subventricular Zone. *Glia*. 57, 136–15210.1002/glia.20741.

Doetsch, F., García-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The journal of Neuroscience*. 1;17(13):5046-61.

- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 11;97(6):703-16.
- Downie, R.S., Tannahil, C. & Tannahill, A. (1996). Health Promotion Models and Values. *Oxford: oxford university press*;
- Drapeau, E., & Nora Abrous, D. (2008). Stem Cell Review Series: Role of Neurogenesis in Age-Related Memory Disorders. *Aging Cell*. 7(4), 569–589.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P.A. (2004). Epigenetics in Human Disease and Prospects for Epigenetic Therapy. *Nature*.429:457-63.
- Elliott B, Joyce E, Shorvon S. (2009). Delusions, illusions and hallucinations in epilepsy: 2. Complex phenomena and psychosis. *Epilepsy Research*. 85(2-3):172-86.
- Encinas, J.M. & Sierra, A. (2012). Neural Stem Cell Deforestation as The Main Force Driving the Age-Related Decline in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Behavioural Brain Research*. 14;227(2):433-9. Epub.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. & Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the Adult Human Hippocampus. *Nature Medicine*. 4, 1313–1317.

- Fazel, S., Wolf, A., Långström, N., Newton, C. R., & Lichtenstein, P. (2013). Premature Mortality in Epilepsy and The Role of Psychiatric Comorbidity: A Total Population Study. *Lancet*. 382(9905), 1646–1654.
- Fernandes, M.J.S. (2013). Epilepsia do Lobo Temporal: Mecanismos e Perspectivas. *Estudos Avançados*. Vol.27 no.77.São paulo.
- Fisher, R. S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P. & Engel Jr, J. (2005). Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ilae) and the International Bureau for Epilepsy (ibe). *Epilepsy*. V.46, n.4, p.470-2.
- Friedman, D., Fahlstrom, R., EPGP Investigators (2013). Racial and ethnic differences in epilepsy classification among probands in the Epilepsy Phenome/Genome Project (EPGP). *Epilepsy research*, 107(3), 306-10.
- Gaitatzis, A., Sisodiya, S. M. & Sander, J. W. (2012), The Somatic Comorbidity of Epilepsy: A weighty but often unrecognized burden. *Epilepsia*. 53: 1282-1293.
- Garzon, E. (2002). Epilepsia Refratária: Conceito e Contribuição das Novas Drogas Antiepilépticas e de outras Modalidades Terapêuticas. *Revista Neurociências*. 10(2): 66-82
- Glauser, T.A. (2007). Designing practical evidence-based treatment plans for children with prolonged seizures and status epilepticus. *Journal of Child Neurology*. 22(suppl 5):38S–46S.

- Gracia, F., De Lao, S.L., Castillo, L., Larreategui, M., Archibold, C., Brenes, M.M. & Reeves, W.C. (1990). Epidemiology of Epilepsy in Guaymi Indians from Bocas Del Toro Province, Republico of Panama. *Epilepsy*. 31:718-23.
- Granieri, E., Rosati, G., Tola, R., Pavoni, M., Paolino, E., Pinna, L. & Monetti, V.C. (1983). A descriptive study of epilepsy in the district of copparo, italy, 1964-1978. *Epilepsy*. 24:502-14.
- Gray, W.P. & Sundstrom, L.E. (1998). Kainic Acid Increases the Proliferation of Granule Cell Progenitors in the Dentate Gyrus of the Adult Rat. *Brain*. 790, 52-59.
- Goldman, S.A & Nottebohm, F. (1983). Neuronal Production, Migration, and Differentiation in a Vocal Control Nucleus of the Adult Female Canary Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 80(8):2390-4.
- Goldberg, E. M & Coulter, D.A. (2013). Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience*. 14, 337–349.
- Gomes, M.M. (1994). Epilepsias: uma prioridade nacional em cuidados de saúde. *Revista Brasileira de Neurologia*. 30(5):141-57.
- Gomes, M. M. (2000). Epidemiologia: distribuição, fatores de risco e considerações prognósticas. In: guerreiro, C. A. M. et al. *Epilepsia*. 2. Ed. São paulo: lemos editorial & gráficos. P. 11-21.

- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flügge, G., & Fuchs, E. (1998). Proliferation of Granule Cell Precursors in The Dentate Gyrus of Adult Monkeys is Diminished by Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(6), 3168–3171.
- Guerreiro, C.A.M. & Palmira, A. (2002). Tratamento Medicamentoso das Epilepsias. In: Guerreiro, C.A.M., Guerreiro, M.M., Cendes, F, Lopes-Cendes.
- Hesdorffer, D. C., Ishihara, L., Mynepalli, L., Webb, D. J., Weil, J. & Hauser, W. A. (2012), Epilepsy, Suicidality, and Psychiatric Disorders: A Bidirectional Association. *Ann Neurol*. 72: 184-191.
- Hitiris, N., Mohanraj, R., Norrie, J. & Brodie, M.J. (2007). Mortality in epilepsy. *Epilepsy & Behavior*. 10(3):363-76.
- Houser, C.R. (1990) Granule Cell Dispersion in The Dentate Gyrus of Humans With Temporal Lobe Epilepsy. *Brain Research*.10;535(2):195-204.
- Hübener, M, Bonhoeffer, T. (2014). Neuronal Plasticity: Beyond the Critical Period. *Cell*. 6;159(4):727-37.
- Hung, Y.W., Yang, D.I., Huang, P.Y., Lee, T.S., Kuo, T.B., Yiu, C.H., Shih, Y.H. & Lin, Y.Y. (2012). The duration of sustained convulsive seizures determines the pattern of hippocampal neurogenesis and the development of spontaneous epilepsy in rats. *Epilepsy Research*. 98, 206–215.
- Hutt, M. S. & Burkitt, D.P. (1986). The Geography of Noninfectious Disease. *Oxford: Oxford University press*.

- Isokawa, M. & Mello, L.E. (1991). Nmda Receptor-mediated Excitability in Dendritically Deformed dentate granule cells in pilocarpine-treated rats. *Neuroscience Letters*. 129(1):69-73.
- Isokawa, M., Avanzini, G., Finch, D.M., Babb, T.L. & Levesque, M.F. (1991). Physiologic Properties of Human Dentate granule cells in slices prepared from epileptic patients. *Epilepsy Research*. 9:242–250.
- Issa, J. P. (2000). CpG-island Methylation in Aging and Cancer. *Current topics in microbiology and immunology*, berlin, v. 249, p. 101-118.
- Jagtap, S. A., Mauskar, A., & Naik, N. (2013). The Risk of Seizure Recurrence After a First Unprovoked Seizure in Childhood: A Prospective Study. *Journal of Pediatric Neurosciences*, 8(1), 73–74.
- Janszky, J., Schulz, R., Janszky, I., et al. (2004). Medial temporal lobe epilepsy: gender differences *Journal of Neurology. Neurosurgery & Psychiatry*, 75:773-775.
- Jessberger, S., Zhao, C., Toni, N., Clemenson, G. D., li, Y., Gage, F. H. (2007). Seizureassociated, Aberrant Neurogenesis in Adult Rats Characterized with Retrovirus-mediated Cell Labeling. *The journal of neuroscience*, 27, 9400–9407.
- Jirtle, R. L. & Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature reviews genetics*. London, v. 8, p. 253-262.
- Kale R. (2002). *The treatment gap. Epilepsia*. 43 suppl 6:31-3.

- Kanner, A. M. (2013), The Treatment of Depressive Disorders in Epilepsy: What all Neurologists Should Know. *Epilepsia*. 54: 3-12.
- Kaplan, M.S. & Hinds, J.W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*. 197(4308):1092–1094.
- Koyama, R. (2014). Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Aberrant Network Reorganization in the Epileptic Brain. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 134(11) 1171-1177.
- Kwan, P. & Brodie, M.J. (2000). Early Identification of Refractory Epilepsy. *New England Journal of Medicine*. 10.1056/NEJM200002033420503.
- Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshé, S. L., Perucca, E., Wiebe, S. and French, J. (2010). Definition of Drug Resistant Epilepsy: Consensus Proposal by the Ad Hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 51: 1069-1077.
- Kuruba, R., Hattiangady, B., & Shetty, A. K. (2009). Hippocampal Neurogenesis and Neural Stem Cells in Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy & Behavior : E&B*, 14 (Suppl 1), 65–73.
- Lazarus, A.A. (1980). *Terapia Multimodal do Comportamento*. Tradução organizada por U.C. Arantes. 2a edição. São paulo: manole (trabalho original publicado em 1975).
- Lorente de nó, R. (1933). Studies on the structure of the cerebral cortex. I. The area entorhinalis. *Journal of Neurology and Psychology*. 45:381–438.

- Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the Structure of the Cerebral Cortex. II. Continuation of the Study of the Ammonic System. *Journal für Psychologie und Neurologie*. 46:113–177.
- Lurton, D., El Bahh, B., Sundstrom, L., Rougier, A. (1998) Granule cell dispersion is correlated with early epileptic events in human temporal lobe epilepsy. *Journal of the Neurologic Science*. Feb 5;154(2):133-6.
- Lynch, M. & Sutula, T. (2000). Recurrent Excitatory Connectivity in the Dentate Gyrus of Kindled and Kainic Acid-Treated Rats. *Journal of neurophysiology*. 83(2):693-704.
- Macdonald, T.H. (1998). *Rethinking health promotion: a global approach*. London: routledge.
- Marchetti, R. L., Castro, A. P. W., Kurcgant, D., Cremonese, E. & Gallucci Neto, J. (2005). Transtornos mentais associados à epilepsia. *Revista de Psiquiatria Clínica*. V.32, n.3, p.170-182.
- Masia, S.L. & Devinsky, O. Epilepsy and behavior: a brief history. (2000). *Epilepsy behavior*. 1(1):27-36.
- Masukawa, L.M., Uruno, K., Sperling, M.R., O'connor, M.J. & Burdette, L.J. (1992). The functional relationship between antidromically evoked field responses of the dentate gyrus and mossy fiber reorganization in temporal lobe epileptic patients. *Brain research*. 579:119-127.
- Mathern, G.W., Kuhlman, P.A., Mendoza, D. & Pretorius, J.K. (1997). Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 56(2):199-212.

- Mathern, G.W., Leiphart, J.L., De Vera, A., Adelson, P.D., Seki, T., Neder, L. & Leite, J.P. (2002). Seizures Decrease Postnatal Neurogenesis and Granule Cell Development in The Human Fascia Dentata. *Epilepsia*. 43(Suppl5):68–73.
- Meldrum, B. S. & Bruton, C.J. (1992). Epilepsy. In: Adams, J.H., Duchen, L.W., editors. *Greenfield's neuropathology*. New york: oxford university press; Pp. 1246–1283.
- Mcnamara, J.O. Cellular and molecular basis of epilepsy. (1994). *Journal of Neuroscience*. 14(6):3413-25.
- Ming, G.L. & Song, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. (2005). *Annual Review of Neuroscience*. 28:223–250.
- Mohapel, P., Ekdahl, C.T. & Lindvall, O. (2004). Status Epilepticus Severity Influences the Long-Term Outcome of Neurogenesis in The Adult Dentate Gyrus. *Neurobiology of Disease*. 15(2):196-205.
- Moshé, S.L., Perucca, E., Ryvlin, P. & Tomson, T. (2015). Epilepsy: New Advances. *Lancet*. 7;385(9971):884-98.
- Mouret, A., Gheusi, G., Gabellec, M.M., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.C. & Lledo, P.M. (2008). Learning and Survival of Newly Generated Neurons: When Time Matters. *The Journal of Neuroscience*. 10.1523/JNEUROSCI.2954-08.2008.

- Murphy, B.L., Pun, R.Y., Yin, H., Faulkner, C.R., Loepke, A.W. & Danzer, S.C. (2011). Heterogeneous integration of adult-generated granule cells into the epileptic brain. *Journal of Neuroscience*. 31, 105–117.
- Neligan, A., Bell, G. S., Shorvon, S. D. & Sander, J. W. (2010), Temporal trends in the mortality of people with epilepsy: A review. *Epilepsia*. 51: 2241-2246.
- Newton, C.R. & Garcia, H.H. (2012). Epilepsy in Poor Regions of The World. *Lancet*. 29;380(9848):1193-201.
- Ngugi, A. K., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Sander, J. W., & Newton, C. R. (2010). Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach. *Epilepsia*,51(5), 883–890.
- Nishio, S., Morioka, T., Hisada, K, Fukui, M. (2000). Temporal Lobe Epilepsy: a Clinicopathological Study With Special Reference to Temporal Neocortical Changes. *Neurosurgical Review*. 23(2):84-9.
- Nowakowski, R.S., Lewin, S.B. & Miller, M.W. (1989). Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the dna-synthetic phase for an anatomically defined population. *Journal of neurocytology*. 18(3):311-8.

- Oh, H.S., Lee, M.C., Kim, H.S., Lee, J.S., Lee, J.H., Kim, M.K., Woo, Y.J., Kim, J.H., Kim, H.I. & Kim, S.U. (2008). Pathophysiologic characteristics of balloon cells in cortical dysplasia. *Childs Nerv Syst.*24(2):175-83. Epub.
- Parent, J.M., Yu, T.W., Leibowitz, R.T., Geschwind, D.H., Sloviter, R.S. & Lowenstein, D.H. (1997). Dentate Granule Cell Neurogenesis is Increased by Seizures and Contributes to Aberrant Network Reorganization in The Adult rat Hippocampus. *Journal of Neuroscience.* 15;17(10):3727-38.
- Parent, J. M. & Lowenstein, D. H. (2002). Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain?. *Progress in Brain Research.* 135, 121-131.
- Parent, J. M. (2007). Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Progress in Brain Research.* 163, 529–817.
- Park, S.A., Kim, T.S., Choi, K.S., Park, H.J., Heo, K. & Lee, B.I. (2003) Chronic Activation of CREB and p90RSK in Human Epileptic Hippocampus. *Experimental & Molecular Medicine.* 31;35(5):365-70.
- Perucca, E., Gram, L., Avanzini, G. & Dulac, O. (1998), Antiepileptic Drugs as a Cause of Worsening Seizures. *Epilepsia.* 39: 5-17.
- Pitkänen, A. (2010). Therapeutic Approaches to Epileptogenesis – Hope on the Horizon. *Epilepsia.* 51(Suppl 3), 2–17.
- Pray, L.A. (2004). Epigenetics: genome meet your environment. *The scientist.* 5 : 14-20.

- Rolando, C. & Taylor, V. (2014) Neural Stem Cell of The Hippocampus: Development, Physiology Regulation, and Dysfunction in Disease. *Current Topics in Developmental Biology*. 107:183-206.
- Rubin, M. & Safdieh, J.E. (2008). *Netter Neuroanatomia Essencial*. 1ªed, elsevier editora ltda.
- Ryvlin, P., Tomson, T. & Montavont, A. (2009). Excess mortality and sudden unexpected death in epilepsy. *Presse Medicale*. 38(6):905-10.
- Ryvlin, P. & Montavont, A. (2008). Does epilepsy surgery really lower mortality? *Neurochirurgie*. 54(3):282-6.
- Ryvlin, P., Nashef, L. & Tomson, T. (2013), Prevention of Sudden Unexpected Death in Epilepsy: A Realistic Goal?. *Epilepsia*, 54: 23-28.
- Sahay, A., Wilson, D.A. & Hen, R. (2011). Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron*. 70(4):582-8.
- Sander, J.W.A.S & Shorvon, S.D. (1987). Incidence and prevalence studies in epilepsy and their methodological problems: a review. *Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry*. 50:829-39.
- Scharfman, H.E., Sollas, A.L. & Goodman, J.H. (2002). Spontaneous Recurrent Seizures After Pilocarpine-Induced Status Epilepticus Activate Calbindin-Immunoreactive Hilar Cells of The Rat Dentate Gyrus. *Neuroscience*. 111(1):71-81.

- Schiller, Y. & Najjar, Y. (2008). Quantifying the Response to Antiepileptic Drugs. *Neurology*. 70(1)54-65.
- Schlett, K. (2006). Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. *Current topics in medicinal chemistry*. 6:949-60.
- Schneider-Mizell, C.M., Parent JM, Ben-Jacob, E., Zochowski, M.R. & Sander, L.M. (2010). From Network Structure to Network Reorganization: Implications for Adult Neurogenesis. *Physical Biology*. 12;7(4):046008.
- Schuele, S.U. & Lüders, H.O. (2008). Intractable epilepsy: management and therapeutic alternatives. *The Lancet neurology*. 7(6):514-24.
- Scorza, Fulvio Alexandre, Guerra, Alexandro de Borja Gonçalves, Cavalheiro, Esper Abrão, & Calil, Helena Maria. (2005). Neurogênese e Depressão: Etiologia ou Nova Ilusão?. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 27(3), 249-253.
- Scott, B.W., Wang, S., Burnham, W.M., de Boni, U. & Wojtowicz, J.M. kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. (1998). *Neuroscience Letters*. 248, 73 –76.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., Collado-Morente, L., Mcewen, B.S. & Alvarezbuylia, A. (2004). Cell Types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *Journal of comparative neurology*. 478:359–378.

- Shinnar, S., Berg, A.T. & Moshé, S.L. (1990). Risk of seizure recurrence following a first unprovoked seizure in childhood: a prospective study. *Pediatrics*. 85(6):107685.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and Pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35.
- Spalding, k. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., Possnert, G., Mash, D.C., Druid, H. & Frisén, J. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*. 153, 1219-1227.
- Spencer, S. & Huh, L. (2008). Outcomes of Epilepsy Surgery in Adults and Children. *Lancet neurology*. 7(6):525-37.
- Steinhäuser, C., Seifert, G. & Bedner, P. (2012), Astrocyte Dysfunction in Temporal Lobe Epilepsy: K⁺channels and gap junction coupling. *Glia*. 60: 1192-1202.
- Sutula, T.P. (2004). Mechanisms of Epilepsy Progression: Current Theories and Perspectives From Neuroplasticity in Adulthood and Development. *Epilepsy Research*. 60(2-3):161-71.
- Swaiman, A.A.S & Ferriero, D. (2012). *Pediatric neurology, principles & practice*. Philadelphia: Mosby Elsevier.
- Tauk, D.L. & Nadler, J.V. (1985). Evidence of Functional Mossy Fiber Sprouting in Hippocampal Formation of Kainic Acid-treated Rats. *Journal of Neuroscience*. 5(4):1016-22.

- Tavares, P.A.N & Gomes-Leal, W. (2011). Neurogenesis in the central nervous system: function and participation in maintenance and repair of neural circuits. *Neurociências*. v. 7, p. 49-57.
- Temkin, O. (1994). The falling sickness: a history of epilepsy from the greeks to the beginnings of modern neurology. Johns hopkins university press, 3-4.
- Thom, M., Zhou, J., Martinian, L. & Sisodiya, S. (2005). Quantitative post-mortem study of the hippocampus in chronic epilepsy: seizures do not inevitably cause neuronal loss. *Brain*. 128 (6) 1, 1344–1357.
- Thored, P., Arvidsson, A., Cacci, E., Ahlenius, H., Kallur, T., Darsalia, V., Ekdahl, C.T, Kokaia, Z. & Lindvall, O. (2002). Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem cells*. 24:739–747.
- Thurman, D. J., Beghi, E., Begley, C. E, Berg, A. T., Buchhalter, J. R., Ding, D., Hesdorffer, D. C., Hauser, W. A., Kazis, L., Kobau, R., Kroner, B., Labiner, D., Liow, K., Logroscino, G., Medina, M. T., Newton, C. R., Parko, K, Paschal, A, Preux, P., Sander, J. W., Selassie, A., Theodore, W., Tomson, T., Wiebe, S. and. (2011). Standards for Epidemiologic Studies and Surveillance of Epilepsy. *Epilepsia*. 52: 2-26.
- Tomson, T.L., Nashef, L. & Ryvlin, P. (2008). Sudden Unexpected Death in Epilepsy: Current Knowledge and Future Directions. *Lancet Neurology*. 7(11):1021-31.
- Torre, E.R., Lothman, E. & Steward, O. (1993). Glial Response to Neuronal Activity: GFAP-mRNA and Protein Levels are Transiently Increased in the Hippocampus After Seizures. *Brain Research*. 24;631(2):256-64.

- Urbach, H., Scheffler, B., Heinrichsmeier, T., Von Oertzen, J., Kral, T., Wellmer, J., Schramm, J., Wiestler, O. & Blümcke, I. (2002). Focal Cortical Dysplasia of Taylor's Balloon Cell Type: A Clinicopathological Entity with Characteristic Neuroimaging and Histopathological Features, and Favorable Postsurgical Outcome. *Epilepsia*. 43: 33-40.
- Van Praag, H., Schinder, A.F, Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D. & Gage, F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 415(6875):1030-4.
- Viteva, E. (2013). Impact of Stigma on The Quality of Life of Patients With Refractory Epilepsy. *Seizure*. 22(1):64-9. Epub.
- WHO. (2010). *Epilepsy*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html>>.
- Wood, J.C., Jackson, J.S., Jakubs, K., Chapman, K.Z., Ekdahl, C.T., Kokaia, Z., Kokaia & M., Lindvall, O. (2011). Functional integration of new hippocampal neurons following insults to the adult brain is determined by characteristics of pathological environment. *Experimental Neurology*. 229, 484–493.
- Wuarin, J.P. & Dudek, F.E. (2011). Excitatory synaptic input to granule cells increases with time after kainate treatment. *Journal of neurophysiology*. 85(3):1067-77.
- Yacubian, E.M.T. (2002). Proposta de Classificação das Crises e Síndromes Epilépticas. Correlação Videoeletrencefalográfica. *Revista Neurociências*. 10(2): 49-65.

- Yemadje, L.P., Houinato, D., Boumédiène, F., Ngoungou, E.B., Preux, P.M. & Druet-Cabanac, M. (2012). Prevalence of Epilepsy in the 15 Years and Older in Benin: a door-to-door nationwide survey. *Epilepsy research*. 99(3):318-26.
- Zhan, R.Z., Timofeeva, O. & Nadler, J.V. (2010). High ratio of synaptic excitation to synaptic inhibition in hilar ectopic granule cells of pilocarpinetreated rats. *Journal of Neurophysiology*, 104, 3293–3304.
- Zhao, C., Deng, W. & Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 22;132(4):645-60.

ANEXOS

ANEXO A

AMBULATÓRIO DE EPILEPSIA

PRIMEIRA CONSULTA

Médico: _____ Data do atendimento: _____
Nome: _____
Registro: _____ Data de nascimento: _ / _ / ____ Idade: _____
Sexo: Feminino Masculino Cor: Branco Pardo Negro Amarelo
Natural: _____ Procedência: _____
Profissão: _____
Escolaridade máx.: _____ Repetiu que anos (qtas. vezes): _____
Estado civil: _____
Dominância manual: Destro Sinistro Ambidestro
Acompanhante: _____
Telefone: _____
Evento Precipitante Inicial (até 5 anos) – Idade: _____
 Nega
 Anóxia perinatal
Crise febril Tipo: Generalizada Focal: Direito Esquerdo > 30 minutos de duração
 Traumatismo craniano com perda de consciência
 Infecção SNC Tipo: _____
 Outro Qual? _____

Detalhar o Evento Inicial: Esclarecer dados como duração da crise, tipo de crise, presença ou não de paralisia de Todd após a crise, seqüelas transitórias ou permanentes, tipo de trauma, presença ou não de complicações, gravidade da infecção, período de internação e ainda descrever com detalhes se houve outro tipo de evento inicial.

Crises epilépticas começaram quanto tempo depois do evento inicial?

Idade da primeira crise epiléptica:

Idade da segunda crise epiléptica:

Idade da terceira crise epiléptica:

Frequência das crises quando a epilepsia iniciou:

Tipo (s) de crises (s) quando a epilepsia iniciou: Detalhar a primeira crise e início da epilepsia, quando as crises se tornaram regulares, perguntando sobre crises focais, crises focais evoluindo para crises epilépticas bilaterais/convulsivas, crises generalizadas, lado da generalização e outros fenômenos lateralizatórios e localizatórios das crises, tempo de duração das crises, duração e

caracterização do pós-ictal. Iniciou tratamento? Qual DAE?

Como foi a evolução das crises e descrever as crises atuais (enumerando cada tipo):

Crises focais Crises focais evoluindo para crises epilépticas bilaterais Crises generalizadas

Crises Focais

1) Sem comprometimento da consciência ou vigilância

Apenas com fenômenos sensitivos sensoriais subjetivos ou fenômenos psíquicos (aura)

• Sintomas somatossensitivos ou dos sentidos especiais:

Olfatória

Gustativa

Auditiva

Visual Hemicampo comprometido: Esquerdo Direito Outro: _____

Somatossensitiva Tipo: Parestesia Dor Anestesia Outro: _____

Região

acometida: _____

Vertiginosa

Cefálica Qual? _____ Lado: Esquerdo Direito Outro: _____

• Psíquica

Alucinação estruturada Tristeza *Déjà vu*

Ilusão Medo *Jamais vu*

Angústia Despersonalização Distorção do sentido de posição

Outro:

Com componentes motores ou autonômicos observáveis (crise parcial simples/focais motoras/autonômicas)

• Autonômica

Cianose Piloereção

Taquicardia Palidez Outro: _____

Sudorese Midríase

• Motora:

Disfásica / Bloqueio afásico

Versiva Lado: Esquerdo Direito

Sem marcha jacksoniana Com marcha jacksoniana Lado: Esquerdo Direito

Descrever o local de início dos movimentos e propagação e caracterizar o tipo de movimento:

2) Com comprometimento da consciência ou vigilância ou crise discognitiva (crise parcial complexa)

Olhos ficam abertos e fixos

Staring

Automatismos Mastigatórios Oroalimentares/deglutição Deambulatórios Gestuais

Membro superior – lado: Esquerdo Direito Ambos
Membro inferior – lado: Esquerdo Direito Ambos
Verbais Palavras compreensíveis Incompreensíveis
Pélvicos Tronco Pedalar Nadar
Roçar o nariz – com a mão: Esquerda Direita Ambos
Manifestações motoras na crise parcial complexa:
Desvio da cabeça na fase inicial da crise – lado: Esquerdo Direito Ambos
Leve desvio do tronco na fase inicial da crise – lado: Esquerdo Direito Ambos
Versão ou desvio cefálico forçado em fase mais tardia da crise – lado: Esquerdo Direito Ambos
Postura distônica da mão – lado: Esquerdo Direito Ambos
Postura tônica de membro superior – lado: Esquerdo Direito Ambos
Membro superior ou inferior imóvel durante a crise – lado: Esquerdo Direito Ambos
Manifestações oculares:
Desvio tônico dos olhos Nistagmo – lado da fase rápida: Esquerdo Direito
Piscamento Unilateral Bilateral
Sensação de movimento do globo ocular Outro:

3) Evoluindo para crise epiléptica bilateral/convulsiva, incluindo componentes tônicos, clônicos ou tônico-clônicos (crise secundariamente generalizada)

Iniciado pela face Membro superior Membro inferior Lado: Esquerdo Direito
Versão óculo-cefálica pré-generalização – lado: Esquerdo Direito

Crises generalizadas

Crises de ausência: Típicas Atípicas

Com características especiais: Ausências mioclônicas Mioclonias palpebrais

Crise mioclônica: Mioclônicas Mioclono-atônicas Mioclono-tônicas

Crise atônica

Crise tônica

Crise clônica

Crise tônico-clônica (em qualquer combinação)

Espasmos epilépticos:

Manifestações pós-ictais – duração:

Automatismos Confusão mental Disfasia Afasia Déficit de nomeação Cefaléia

Vertigem Sonolência Alteração do comportamento Mialgia

Paralisia de Todd – lado: Esquerdo Direito Tempo: _____

Outros:

Horário preferencial das crises atuais e fatores desencadeantes:

Predominantemente no sono Privação de sono

Predominantemente durante vigília Hiperventilação

No despertar Fotostimulação

Sem relação com ciclo sono-vigília Febre

Em cluster Etilismo

Estresse físico e/ou emocional, ansiedade, cansaço Catameniais (durante o período menstrual)

Outros:

Freqüência atual das crises:

Crises diárias – quantas por

dia: _____

Crises semanais – quantas por semana:

Crises mensais – quantas por
mês: _____
 Crises com outra frequência – detalhar a frequência: _____

Data da última crise: _____

Período de remissão (mais de um ano sem crises após o início da epilepsia) – quando?

Sem DAE Qual a DAE utilizada na
época: _____

Quantas crises secundariamente generalizadas até hoje?
< 5 5-10 10-20 20-50 > 50 _____ Indeterminado

Estado de Mal Epiléptico ou crises subentrantes (tipo, duração, idade):

Esquema terapêutico atual (drogas, posologia, tempo de uso, efeitos colaterais):

Drogas já utilizadas (dose máxima utilizada, motivo da suspensão e efeitos colaterais):

Antecedentes:

Gestação, nascimento e parto – detalhar abaixo:

Pais consangüneos: Não Sim, detalhar parentesco: _____

Pré-natal: Não Sim, complicações: _____

Parto domiciliar Parto hospitalar

A termo Pré-termo: _____ Pós-termo: _____

Complicações perinatais:

DNPM e doenças graves da infância:

Desenvolvimento intelectual e linguagem: Normal Atrasado: _____

Desenvolvimento motor: Normal Atrasado: _____

Comorbidades (psiquiátricas, clínicas) e outros medicamentos utilizados:

Menstruação: Regular Irregular, desde

quando: _____

Uso de drogas, álcool, tabagismo:

Álcool: Não Social Etilista: _____

Tabagismo: Não Sim, quantos cigarros/dia e tempo: _____

Drogas ilícitas: Não Sim, quais, há quanto tempo: _____

Familiares com epilepsia ou crise febril:

Se necessário, desenhar heredograma:

Exame físico:

Peso: _____

Exame neurológico: Incluir avaliação subjetiva do estado mental, a queixa do paciente sobre a memória e sua avaliação subjetiva sobre a memória _____

Exames: Detalhar origem dos exames e data

EEG (Origem e data):

Tomografia (Origem e data):

Ressonância magnética (Origem e data):

Outros (Origem e data):

DIAGNÓSTICO

Tipo de crise:

- Crises focais
- Sem comprometimento da consciência ou vigilância
- Com comprometimento (Discognitivo)
- Evoluindo para crise epiléptica bilateral/convulsiva
- Crises generalizadas

Topografia – lobo e

lado: _____

Etiologia:

- Genética (Idiopática)
- Estrutural/metabólica (Sintomático)
- Causa desconhecida (Criptogênico)

Síndrome: _____

Condução:

ANEXO B

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 REFRATÁRIA 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