UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Claudimar Amaro de Andrade Rodrigues

Expressão gênica das subunidades e subtipos de receptores para neurotransmissores excitatórios e inibitórios no Complexo Basolateral de Amígdala de pacientes com Epilepsia Intratável do Lobo Temporal Mesial (ELTM).

Ribeirão Preto

2016

Claudimar Amaro de Andrade Rodrigues

Expressão gênica das subunidades e subtipos de receptores para neurotransmissores excitatórios e inibitórios no Complexo Basolateral de Amígdala de pacientes com Epilepsia Intratável do Lobo Temporal Mesial (ELTM).

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências Médicas.

Programa: Clínica Cirúrgica
Opção: Morfologia e Cirurgia Experimental.

Orientador: Prof. Carlos Gilberto Carlotti Junior

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo, pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Rodrigues, Claudimar Amaro de Andrade

Expressão gênica das subunidades e subtipos de receptores paraneurotransmissores excitatórios e inibitórios no Complexo Basolateral de Amígdala de pacientes com Epilepsia Intratável do Lobo Temporal Mesial (ELTM).

Número de páginas 76

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

1. Amígdala 2. Epilepsia 3. Neurotransmissor 4. Lobo temporal

Folha de Aprovação

Claudimar Amaro de Andrade Rodrigues

Expressão gênica das subunidades e subtipos de receptores para neurotransmissores excitatórios e inibitórios no Complexo Basolateral de Amígdala de pacientes com Epilepsia Intratável do Lobo Temporal Mesial (ELTM).

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
a obtenção de Título de Doutor em Ciências
Médicas.

Programa: Clínica Cirúrgica
Opção: Morfologia e Cirurgia Experimental.

Orientador: Prof. Carlos Gilberto Carlotti Junior

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus avós, Amaro de Andrade e
Yolanda de Castro Andrade,
que sempre me fortalecem
e estão apoiando esta jornada
acadêmica e profissional
de outro plano.

Agradecimentos

A minha família, em especial a minha esposa, Fernanda Marques Rey, e sua quase infinita paciência, a minha mãe, Mariza Aparecida de Andrade Rodrigues, meu pai, Claudino José Rodrigues, e minha irmã, Tânia Mara de Andrade Rodrigues, pelos apoios e broncas.

Ao Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior pela confiança e exemplo de formação pessoal e docente, assumindo desafios e responsabilidades nos mais diversos espaços acadêmicos e científicos, desempenhando seus papéis com amor e eficiência.

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, em especial a Professora Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, a técnica Renata Danielle Sicchieri e doutoranda Andressa Romualdo Rodrigues, e a técnica do Laboratório Multiusuário da FMRP-USP, Lilian Eslaine Costa Mendes da Silva, pelo grande auxílio, cuidado e apoio na elaboração desta pesquisa.

Aos professores oficiais, docentes da FMRP-USP, preceptores do HC-FMRP-USP, docentes da USP e de outras instituições, que nestes mais de 10 anos de atividades acadêmicas e extra-acadêmicas, nos mais diversos espaços de formação acadêmica, alimentaram a vontade de um dia ter esta oportunidade e responsabilidade, apesar dos obstáculos.

Aos professores officiosos, funcionários e estudantes da FMRP-USP, funcionários e residentes do HCFMRP-USP, funcionários e estudantes de outras instituições que propiciaram a conexão emocional humana à técnica

fria, construindo uma visão de que só é possível criar um modelo integral de saúde e educação com uma equipe multiprofissional integrada e compromissada.

Ao Centro Acadêmico “Rocha Lima”, a Associação de Pós-graduandos da USP-RP, a Associação Brasileira de Educação Médica, a Diretoria Nacional dos Estudantes de Medicina, a Associação Nacional de Pós-graduandos e ao Núcleo de Ribeirão Preto do Centro Brasileiro de Estudos de Saúde, por me fazer ter certeza que a busca por uma sociedade justa é possível e necessária, devendo ser realizada em todos os espaços sociais.

Aos amigos, pessoas especiais que encontramos nestes e em outros espaços, que apesar do tempo e da distância, estamos sempre juntos, se apoiando mutuamente nas lutas e nas dificuldades, dividindo alegrias e sucessos, e construindo caminhos inter cruzados que se refletiram nesta construção e na essência de nossas vidas. Apenas me desculpem por não colocar seus nomes, em respeito àqueles que certamente esqueceria de lembrar no papel, mas nunca esqueço de lembrar no coração.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa e financiamento da pesquisa.

Aos leitores da tese por se interessarem em avançar no entendimento da epilepsia de lobo temporal e sua relação com a amígdala, e afins, na qual espero ajudar em alguma coisa.

Epígrafe

“O verdadeiro saber está consciente da ignorância;
e o modo como sinto as lacunas em meu saber é doloroso.
É por isto que nunca me detenho perante qualquer parte do conhecimento,
gosto de aprender, mas a minha opinião defendo-a com convicção.
Dizes-me que sou um fantasista, o que certamente será verdade.
Um grande pensamento arrasta-me para além das medidas.
Sou demasiado irrequieto [...].
(e) prossigo com seriedade um sentimento
de obter uma maior formação espiritual
da que é comum encontrar na maior parte das pessoas [...].”

Carta escrita por Virchow a seu pai em 1842.

Resumo

RODRIGUES, C. A. A. **Expressão gênica das subunidades e subtipos de receptores para neurotransmissores excitatórios e inibitórios no Complexo Basolateral de Amígdala de pacientes com Epilepsia Intratável do Lobo Temporal Mesial (ELTM).** 2016 76f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introdução: A epilepsia é uma doença de grande relevância médica e social, trazendo grande impacto aos pacientes e a sociedade como um todo. A Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) é a epilepsia refratária mais prevalente, tendo em sua causalidade o impacto do desequilíbrio entre circuitos neuronais excitatórios e inibitórios, necessitando da remoção cirúrgica das estruturas alteradas e da interrupção das suas vias para melhor controle das crises e qualidade de vida dos pacientes. **Objetivo:** Buscando ampliar o esclarecimento do papel da amígdala junto as modificações intrínsecas nos receptores de neurotransmissores e em suas subunidades nos mecanismos de ictogênese e epileptogênese, possibilitando o aprimoramento das técnicas cirúrgicas atualmente empregadas, além de novas modalidades terapêuticas, o presente estudo analisou as expressões gênicas das subunidades de receptores excitatórios, NMDA (NR2C e NR3A, genes GRIN2C e GRIN3A), Cainato (GluK1 e GluK2, genes GRIK1 e GRIK2), e subunidade de receptor inibitório GABAA ($\alpha 4$ e $\alpha 5$, genes GABRA4 e GABRA5) e subtipos de receptor de neuropeptídeo Y (Y2 e Y5, com genes NPY2R e NPY5R), em núcleos basolaterais de amígdalas humanas de pacientes com ELTM. **Material e Métodos:** Foram utilizados fragmentos de amígdala de 20 pacientes que fizeram amigdalohipocampectomia junto ao Serviço de Neurocirurgia do HC-FMRP-USP, sendo 10 pacientes com controle efetivo pós-operatório (Engel 1) e 10 pacientes com controle inadequado das crises (Engel 3 e 4), 10 amígdalas obtidas de autópsias (controle), utilizando a qPCR. **Resultados:** Foram evidenciadas diferenças da expressão nas subunidades NR2C ($p=0,006$) e $\alpha 4$ do GABAAR ($p=0,008$), subtipo de NPYr Y2 ($p=0,013$), com tendência junto a subunidade NR3A ($p=0,077$). Não evidenciando significância estatísticas nas análises das subunidades GluK1 ($p=0,147$), GluK2 ($p=0,182$) e $\alpha 5$ do GABAAR ($p=0,272$), para o subtipo NPYr Y1 ($p=0,242$). **Conclusão:** As análises sugerem diferenças na expressão de receptores de neurotransmissores em pacientes com epilepsia em relação ao controle contendo as subunidade NR2C e $\alpha 4$ do GABAAR, com tendências a

subunidade NR3A, indicando modificações neuronais amigdalianas possivelmente envolvidas com a zona epileptogênica, possibilitando aprimoramentos terapêuticos junto ao tratamento das epilepsias refratárias. Também podemos inferir que os mecanismos neuronais envolvendo as subunidades $\alpha 4$ do GABA_Ar e GRIN2C, e do subtipo Y2 do NPYr na epileptogênese e ictogênese da ELTM podem ser semelhantes entre amígdala e hipocampo, enquanto os envolvendo as subunidades GLUK1 e GLUK2 parecem ser diferenciados; o gene GABRA5 pode ser utilizado como gene de controle endógeno em estudos com amígdala e hipocampo na ELTM.

Palavras-Chave: Amígdala, Epilepsia, Neurotransmissor, Lobo Temporal

Abstract

RODRIGUES, C. A. A. **Gene expression of the subunits and receptor subtypes for excitatory neurotransmitters and inhibitory in the patients basolateral complex Amygdaloid with Intractable Mesial Temporal Lobe Epilepsy (MTLE).** 2016.

76f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introduction: Epilepsy is a disease with highly medical and social relevance, bringing impact on patients and society as a whole. Mesial Temporal Lobe Epilepsy (MTLE) is the most prevalent refractory epilepsy, in its causality the impact of the imbalance between excitatory neuronal circuits and inhibitory, needing a surgical removal of the altered structures and the interruption of their way to better seizure control and quality of life patients. **Goal:** Searching to increase understanding the role of the amygdala with intrinsic changes in neurotransmitter receptors and their subunits in ictogenesis mechanisms and epileptogenesis, enabling the improvement of surgical techniques currently used, as well as new therapeutic modalities, this study analyzed gene expression on the subunits of excitatory receptors, NMDA (NR2 and NR3A, GRIN2C and GRIN3A genes) and kainate (GluK1 and GluK2, GRIK1 and GRIK2 genes), and inhibitory receptor subunit GABA ($\alpha 4$ and $\alpha 5$, genes GABRA4 and GABRA5), neuropeptide Y receptor subtypes (Y2 and Y5, and NPY5R with NPY2R gene) in the basolateral nucleus of human amygdala of patients with MTLE. **Material and Methods:** Amygdala fragments were used in 20 patients who made amygdalohypocampectomy with the Service neurosurgery HC-FMRP-USP, 10 patients with postoperative effective control (Engel 1) and 10 patients with inadequate control of seizures (Engel 3:04), and 10 amygdalas obtained from autopsies (control) using qPCR. **Results:** Were differences evidenced expression in NR2C subunits ($p = 0.006$) $\alpha 4$ the GABAAR ($p = 0.008$), and subtype NPYr Y2 ($p = 0.013$), along with a tendency of NR3A subunits ($p = 0.077$). Showing no statistical significance in the analysis of GluK1 subunits ($p = 0.147$), GluK2 ($p = 0.182$) $\alpha 5$ the GABAAR ($p = 0.272$), and the NPYr Y1 subtype ($p = 0.242$). **Conclusion:** The analyzes suggest differences in expression of neurotransmitter receptors in epilepsy patients on control containing the NR2C subunits and $\alpha 4$ of GABAAR with NR3A subunits trends indicating amygdala neuronal modifications possibly involved in the epileptogenic zone, enabling therapeutic improvements with the refractory epilepsy treatment. As well can infer that the

neural mechanisms involving the subunits $\alpha 4$ GABA_AR, GRIN2C and Y2 NPY_r subtype in epileptogenesis and ictogenesis of TLE can be similar between the amygdala and hippocampus, while involving GLUK1 and GLUK2 subunits appear to be different; the GABRA5 gene can be used as endogenous control gene in studies of hippocampus and amygdala in TLE.

Keywords: Amygdala, epilepsy, Neurotransmitter, Temporal Lobe

Lista de Tabelas

Tabela 1- Dados clínicos dos pacientes com ELTM – Grupo 1/ENGEL 1.	41
Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes com ELTM – Grupo 2/ENGEL 3 e 4	42
Tabela 3 - Valores Relativos (FOLD) para as subunidades analisadas nos Grupo1/ENGEL1, Grupo2/ENGEL 3 e 4.	50

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Análise estatística do NMDAr – NR2C (GRIN2C)	47
Gráfico 2 – Análise estatística do NMDAr – NR3A (GRIN3A)	47
Gráfico 3 – Análise estatística do KAr – GluK1 (GRIK1)	48
Gráfico 4 – Análise estatística do KAr – GluK2 (GRIK2)	48
Gráfico 5 – Análise estatística do GABAr – α 4 (GABRA4)	48
Gráfico 6 – Análise estatística do GABAr – α 5 (GABRA5)	48
Gráfico 7 – Análise estatística do NPYr – Y2 (NPY2R)	49
Gráfico 8 – Análise estatística do NPYr – Y5 (NPY5R)	49

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMPAr	receptor glutamatérgico preferencialmente ativados pelo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
cDNA	DNA complementar
CPC	crise parcial complexa
CTCG	crise tônica clônica generalizada
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desorribonucleotídeo trifosfatado
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
ELTM	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial
ELTM-EH	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial com esclerose hipocampal
ELTM-NL	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial sem esclerose hipocampal
ELTN	Epilepsia do Lobo Temporal Neocortical
FEM	feminino
FRET	Transferência de Energia por Ressonância Foster
GABA	ácido Gamma-aminobutírico
GABAAr	receptor ativado pelo ácido Gamma-aminobutírico tipo A
IC	intervalo de confiança
ILAE	Liga Internacional Contra a Epilepsia (<i>International League Against Epilepsy</i>)
KAr	receptor glutamatérgico preferencialmente ativado por cainato (<i>Kainate</i>)
MASC	masculino
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAr	receptores preferencialmente ativados por N-metil-D-aspartato
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NPY	neuropeptídeo Y
NPYr	receptor de neuropeptídeo Y
PBS	Tampão fosfato salino (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR-RT	Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em tempo real
RNA	ácido ribonucleico

Sumário

Resumo	8
<i>Abstract</i>	10
Lista de Tabelas	12
Lista de Gráficos	13
Lista Abreviaturas e Siglas	14
1-Introdução	16
1.1 Epilepsia e epilepsia de lobo temporal	16
1.2 Amígdala na ELTM	27
1.3 Neurotransmissores na ELTM	29
1.4 Receptor NMDA - Neurotransmissão Excitatória	30
1.5 Receptor Cainato – Neurotransmissão Excitatória	33
1.6 Receptor GABAA – Neurotransmissão Inibitória	34
1.7 Receptor de NPY – Neurotransmissão Inibitória	36
1.8 A importância do estudo com tecido de amígdala humano	37
2- Objetivo	39
3- Metodologia	40
3.1 Casuística	40
3.2 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA) dos genes	43
3.3 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR-RT)	44
3.4 Estatística	46
4- Resultados	47
5- Discussão	51
5.1 O aumento das subunidades NMDA – NR2C e NR3A	51
5.3 A ausência de significância junto as subunidades KAr – K1 e K2	52
5.4 Os achados diferenciais entre GABAA – $\alpha 4$ e $\alpha 5$	53
5.5 Os achados diferenciais entre Y2 e Y5	55
5.6 Os achados diferenciais entre os grupos Engel 1 e Engel 3 e 4	55
6- Conclusão	57
7- Referências	59
8- Anexos	76

1. Introdução

O Sistema Nervoso é formado por uma rede de células em cadeia que transmitem e processam as informações, estabelecendo a relação entre o homem e o mundo à sua volta. Sua organização em circuitos e interligações necessitam de estruturas especializadas para estabelecer um adequado fluxo de informações e processamento. Desta forma, os neurônios, células responsáveis majoritariamente por este processo, organizam a sinalização neural principalmente pelas sinapses, que possibilitam modificações eletroquímicas e variações do potencial elétrico das membranas celulares dos neurônios, gerando as interpretações das informações e suas ações decorrentes, conectando o homem ao seu entorno (Linden, 1999).

Quando estas redes neuronais se desorganizam, as informações se confundem e começam a produzir modificações do funcionamento fisiológico, o que pode gerar segundo John Hughlings Jackson, “uma descarga súbita excessiva e rápida da substância cinzenta” (Da Mota Gomes, 2006) que “pode alterar consciência, sensações e comportamentos” (Howell, 2010). Esta é a apresentação da epilepsia.

1.1 Epilepsia e epilepsia de lobo temporal

Desde tempos remotos esta doença intriga o entendimento da humanidade e até hoje muitos ainda consideram a “doença da queda” (Gravitz, 2014) como uma doença sagrada (Wilmschurst *et al.*, 2014). Seguindo o espírito Hipocrático, que a considerava nem mais, nem menos, sagrada que qualquer outra doença (Sperk *et al.*, 1998; Cairus e Ribeiro Jr, 2005), teorias e evidências vão se ampliando e modificando o saber da humanidade sobre esta doença (Da Mota Gomes, 2006; Magiorkinis *et al.*, 2010; Wolf, 2014).

A epilepsia é caracterizada atualmente por uma ou mais crises convulsivas, não provocadas, em pessoas que possuem alta probabilidade de ter uma nova crise ou possuem uma síndrome epiléptica diagnosticada (Fisher *et al.*, 2014). Também é a doença neurológica não infecciosa mais comum, com prevalência na população de 4 a 10 caso a cada 1000 habitantes em países desenvolvidos, na sua maioria jovens, sendo que em países em desenvolvimento as taxas são de 14 a 57 casos por 1000 habitantes, com maior prevalência em áreas rurais (Noronha *et al.*, 2007; Tellez-Zenteno e Hernandez-Ronquillo, 2012; Savage,

2014). No Brasil a prevalência da epilepsia é estimada entre 1,5 a 57 casos a cada 1000 habitantes, com estudos apresentando valores intermediários, como 18,6 casos pro 1000 habitantes (Borges *et al.*, 2004) e 11,9 a 21 casos por 1000(Noronha *et al.*, 2007). Mesmo ponderando as discrepâncias entre os valores devido às metodologias adotadas ou os vieses dos estudos (Bell *et al.*, 2014), a epilepsia é considerada um problema mundial de grande relevância médica e social, devendo receber um olhar especial desde as autoridades sanitárias, até a população em geral, incluindo, especialmente, a comunidade científica (Hauser, 1998; Tellez-Zenteno e Hernandez-Ronquillo, 2012).

A epilepsia em países do hemisfério sul representam um desafio a mais para o cuidado da população, tendo em vista a limitação de recursos financeiros e as discrepâncias na atenção à saúde (Caraballo e Fejerman, 2015). Este encargo social se concentra nos pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso (Laxer *et al.*, 2014) e nos pacientes pobres, ampliando o problema social (Wilmschurst *et al.*, 2014; Begley e Durgin, 2015). No Brasil, mesmo em municípios polos do estado mais rico da federação, temos de 28,5% a 38% do controle adequado de crises na população com epilepsia, evidenciando uma grande lacuna no tratamento da epilepsia no Brasil (Borges *et al.*, 2004; Noronha *et al.*, 2007).

A epilepsia possui outros reflexos sociais e culturais que impactam na qualidade de vida do paciente, principalmente aqueles acometidos de epilepsia refratária ao tratamento (Laxer *et al.*, 2014). A relação de inclusão e adaptação social propiciada pelo trabalho (Quintaneiro *et al.*, 2001) é geralmente retirada do paciente com epilepsia, muito além das reais necessidades condizentes com a saúde e segurança do trabalho e a incapacidade funcional, principalmente se este possui uma frequência maior de crises (Sarmento e Minayo-Gomez, 2000; Jacoby *et al.*, 2004; Da Mota Gomes, 2009; Gomes, 2009; M.Miziara *et al.*, 2011).

No aspecto cultural, o estigma em torno do paciente epilético ainda é mantido e perpetuado, tendo a pesquisa, a divulgação científica e a educação em saúde um compromisso ainda negligenciado em gerar um novo olhar da sociedade sobre a epilepsia (Savastano, 1967; Jacoby *et al.*, 2004; Jacoby *et al.*, 2005; Lowenstein, 2008; Howell, 2010).

O entendimento do senso comum sobre as epilepsias se modifica com o tempo, a classificação acadêmica tende a ser organizada e revisada periodicamente pela comunidade científica internacional nos grupos de trabalho de especialistas junto a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE, sigla do inglês) integrando a evolução do entendimento sobre a doença com a homogeneidade dos termos utilizados em todo mundo.

Esta classificação das crises ou síndromes epiléticas relacionam diversas características em conjunto (manifestações motoras, sensoriais, emocionais, psíquicas e autonômicas; alterações dos níveis de consciência; idade de início de crises; fatores etiológicos e achados genéticos, clínicos e de exames subsidiários) de forma a diferenciar tipos e subtipos específicos etiologicamente e fisiopatologicamente (Jerome Engel, 2001; Manford, 2001; Sirven, 2002; Berg e Scheffer, 2011).

As crises que acometem pequenas redes neurais ou são exclusivas de um hemisfério cerebral são chamadas de crises focais ou crises parciais. Elas acometem aproximadamente 50 a 60% dos pacientes e são a manifestações ictais mais comuns da epilepsia humana (Wiebe, 2000).

A Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) ou Epilepsia Límbica, como já foi chamada (Travers, 1991) ou como ainda hoje é usada para explicitar a pluralidade das estruturas envolvidas (Bertram, 2009), é uma epilepsia focal que acomete cerca de 30% dos pacientes com epilepsia (Tellez-Zenteno e Hernandez-Ronquillo, 2012; Curia *et al.*, 2014), equivalendo a 60-75% com epilepsias focais (Sirven, 2002).

A ELTM é um subtipo da Epilepsia de Lobo Temporal (ELT) diferenciada da Epilepsia do Lobo Temporal Neocortical (ELTN) pela interconexão ao circuito neural das estruturas límbicas do lobo temporal (hipocampo, amígdala, córtex entorrinal, perirrinal e parahipocampal), diferenciada do envolvimento das regiões corticais do Lobo temporal na ELTN. Para melhor entendimento da fisiopatologia da ELTM, devemos também excluir outras causas geradoras de crises que podem localizar-se nesta região, como displasias, tumores e malformação vasculares, que podem desencadear crises semelhantes pelo envolvimento das mesmas estruturas mesiais, mas teriam em sua própria modificação do sistema nervoso a sua ictogênese primária (Engel, 1996).

Para melhor entendimento da ELTM se faz necessário entender as características fisiológicas e patológicas que caracterizam estes circuitos neurais, como eles se modificam e se envolvem em outras doenças, como as psiquiátricas, ou nas manifestações das crises, para posteriormente analisarmos as modificações morfológicas e neuronais que transformam estes circuitos potenciais em geradores ou propagadores de crises.

O envolvimento da memória e as emoções com as estruturas do lobo temporal mesial são conhecidas de longa data, geralmente através de casos onde se estudavam alterações de função em decorrência de lesões em áreas específicas, relacionando a função específica com a estrutura cerebral afetada. Apesar das associações direta de estruturas

particulares com algumas funções específicas (como o hipocampo e sua relação com a memória declarativa e a organização das lembranças, córtex perirrinal e processamento memórias visuais, táteis e o reconhecimento baseado na familiaridade, córtex parahipocampal na recuperação contextual e na memória espacial, a amígdala em sua relação com a memória não-declarativa e o medo) não é possível associar dicotomicamente as estruturas límbicas e suas funções, entendendo que existe uma complexidade de conexão que estabelece funções compartilhadas coletivamente entre estas, como na memória episódica e semântica, que também podem se associar com estruturas extra-límbicas, como a relação destas estruturas com o neocórtex para estabelecimento na manutenção de memórias de longo prazo (Squire, Larry R *et al.*, 2004; Heimer e Van Hoesen, 2006; Eichenbaum *et al.*, 2007).

Ao pensarmos nas alterações das estruturas fisiológicas neurais com doença, automaticamente fazemos um *link* entre a epilepsia e as doenças psiquiátricas que historicamente já são relacionadas pela sociedade (Reynolds e Trimble, 2009) indo ao encontro dos achados de científicos (Jones *et al.*, 2007).

Em geral a prevalência destas morbidades são maiores nos pacientes com epilepsia, aproximadamente 23,5-37%, comparada com a população sem epilepsia, sendo 13%, sendo as mais comuns as associações com psicoses (2-7%), depressão (17-30%), ansiedade (10-25%), e com aumento da ideação suicida nesta população (25%) (Tellez-Zenteno *et al.*, 2007). Este impacto é ainda maior nos pacientes na ELTM observando uma prevalência 7-10% de psicoses (Clancy *et al.*, 2014), 22% de sintomas obsessivo compulsivo (22%) (Isaacs *et al.*, 2004) e 19-55% de depressão, chegando até 80% segundo alguns autores (Gonçalves e Cendes, 2011; Kandratavicius *et al.*, 2012; Valente e Busatto Filho, 2013), com taxas de suicídio de 5 a 25 vezes entre os pacientes com ELT comparado com a população em geral (Kanner, 2009).

Estes dados mostram que as estrutura límbicas podem estar envolvidas na geração das doenças psiquiátricas, e se correlacionarem com a epilepsia pois as morbidades psiquiátricas são mais frequentes em epilepsias refratárias ao tratamento (Laxer *et al.*, 2014), sendo relatado tanto melhora das morbidades psiquiátricas após controle cirúrgico da ELTM (D'alessio *et al.*, 2014) quanto piora, podendo estas discrepâncias se relacionarem ao tipo de abordagem cirúrgica (Bujarski *et al.*, 2013).

Considerando a inter-relação entre as duas doenças, a amplitude das redes neurais envolvidas na geração das crises epiléticas é maior nos pacientes com doenças psiquiátricas, fato correlacionado aos achados de avaliações funcionais. Os dados ainda não são definitivos para relacionar a presença de doença psiquiátrica com um pior prognóstico de controle das

crises pós-cirúrgico ou a ampliação da área a ser ressecada (Adams *et al.*, 2012). Esta relação funcional das estruturas do lobo temporal com a epilepsia, possibilita um estudo conjunto da fisiologia e de doenças associadas a estas redes neuronais, em especial as doenças psiquiátricas (Ganzola *et al.*, 2014; Soto *et al.*, 2014) possibilitando uma inter-relação de conhecimentos entre as áreas clínicas e científicas em uma ampliação conjunta do conhecimento das morbidades e suas relações estruturais e moleculares (Kandratavicius *et al.*, 2012; Dedeurwaerdere *et al.*, 2014; Kanner *et al.*, 2014).

Outro produto da relação entre as alterações moleculares na epilepsia e as funções neuronais das estruturas cerebrais é a semiologia das crises, que gera uma sintomatologia de crise característica da ELTM, geralmente indistinguível entre seus subtipos, mas que auxilia na lateralização (Hoffmann *et al.*, 2008) ou na identificação de focos bilaterais iniciadores de crises (Řehulka *et al.*, 2014; Loesch *et al.*, 2015). Os sintomas normalmente referidos são: sensação de mal estar epigástrico súbito, ocorrendo em 96% dos pacientes (Landazuri, 2014); sensações emocionais súbitas (geralmente medo); ocasionalmente alucinações olfatórias ou gustatória ou sensação de “*déjà vu*”. Conjuntamente a estas manifestações, a pessoa vai assumindo uma posição característica, com desvio e apreensão do olhar, capacidade de resposta alterada, automatismos oroalimentares e gestuais, presente em aproximadamente 42% e preditora de lateralização em 67% (Dupont *et al.*, 2015). A duração típica das crises fica entre 1 a 2 minutos, com amnésia e confusão pós-ictal que pode durar alguns minutos (Engel, 1996; Cendes *et al.*, 2014). A análise da generalização secundária pode também auxiliar na lateralização das crises, como a distonia mantida ou a versão da cabeça para o lado contralateral da lesão, presente em aproximadamente 96% dos pacientes (Dupont *et al.*, 2015). A manutenção da fala durante a crise ou a afasia pós-ictal auxiliam na lateralização do hemisfério dominante. Analisando eletroencefalograficamente o padrão interictal de espículas é localizado em 96% dos pacientes na região anterotemporal (T3-F7/T4-F8) do padrão 10/20, podendo ser auxiliado por achados em eletrodos esfenoideais e FT9/FT10; enquanto o padrão ictal é de ondas típicas de 5-9Hz na região temporal (Andrade-Valença *et al.*, 2006; Landazuri, 2014). Deve-se saber que a epilepsia neocortical em uma área silenciosa não temporal que se propague para uma via límbica pode gerar uma semiologia de crise idêntica a ELTM (Engel, 1996), mas achados eletroencefálicos podem diferenciá-la de uma ELTM.

Ao analisarmos especificamente as estruturas límbicas o achado característico da ELTM, relacionado as estruturas cerebrais envolvidas na geração da crise, é a esclerose mesial temporal, caracterizada pela diminuição neuronal associada a gliose. Este termo é considerado mais adequado ao se tratar da ELTM devido a variedades de estruturas com

achados escleróticos semelhantes, com o córtex entorrinal, neocórtex (Andrade-Valença *et al.*, 2006) e amígdala (Al Sufiani e Ang, 2012; Curia *et al.*, 2014), mas o achado mais abordado na literatura é a esclerose hipocampal (Manfredi *et al.*, 1992).

A ELTM com esclerose hipocampal (ELTM-EH) é uma síndrome isolada pela nova classificação da ILAE (Guilhotoa, 2011). Representa entre 44-73% das ELTM, caracterizada pela grande perda de células piramidais e gliose nas regiões hipocampais conhecidas como CA1, CA4 e em menor monta em CA3, preservando CA2, comumente acompanhada de dispersão na camada granular e neurônios ectópicos na camada celular do giro denteado (Blumcke *et al.*, 1999; Bote *et al.*, 2008; Al Sufiani e Ang, 2012; Malmgren e Thom, 2012). Achados de reações estruturais adaptativas (brotamento de axônios colaterais e neurogênese com dispersão neuronal), mudanças funcionais em células gliais, perda da integridade da barreira hematoencefálica e neuroinflamação são também encontrados nos espécimes humanos e em modelos animais associados a esclerose hipocampal (Curia *et al.*, 2014). A ILAE padronizou 4 tipos de ELTM-EH sendo ELTM-EH tipo 1: equivalente a lesão clássica com perda neuronal ampla em CA1 e CA4, afetando outras áreas hipocampais, englobando de 60-80% dos casos; ELTM-EH tipo 2: comprometimento amplo de CA1 com razoável preservação de outras áreas, 5-10% dos casos; ELTM-EH tipo 3: com grande perda neuronal em CA4 e giro denteado e razoável perda nas outras áreas; e ELTM-EH tipo 4: com manutenção neuronal mas ampla gliose reativa evidenciada, achado em 20% dos casos (Blumcke *et al.*, 2013; Cendes *et al.*, 2014).

Para além da ELTM-EH, outras variantes da ELTM de acordo com as regiões límbicas ou estruturas majoritariamente envolvidas na geração de crises ou com modificações estruturais típicas são denominadas na literatura como ELTM sem esclerose hipocampal (ELTM-NL), Epilepsia temporal “mais” ou Extra Temporal Epilepsia (Harroud *et al.*, 2012; Cendes *et al.*, 2014), ELT com alargamento da amígdala, ou Epilepsia Amigdaliana (Wieser, 2000; Al Sufiani e Ang, 2012; Lv *et al.*, 2014; Kimura *et al.*, 2015), sendo importante suas considerações e diferenciações na avaliação diagnóstica, na proposta terapêutica e no prognóstico a ser apresentado ao paciente.

Outras áreas distantes do lobo temporal mesial também apresentaram modificações em decorrências da ELTM como tálamo, córtex frontal e parietal, principalmente ipsilateral, mas também contralateral (Cascino, 2005; Bertram, 2009; Santana *et al.*, 2010). As alterações funcionais e estruturais de conectividade na ELTM apresentam-se dissociadas, apresentando um padrão maior de alterações estruturais nas conexões entre

Região Posterior do Giro do Cíngulo com Tálamo, Giro parahipocampal e hipocampo, e alterações funcionais em hipocampo, giro parahipocampal e tálamo (Chiang et al., 2015).

Com todas estas modificações e disfunções envolvidas, associadas ou não a outras doenças, o controle da epilepsia se faz necessário, e na ELTM algumas particularidades devem ser conhecidas e estudadas.

A primeira abordagem para controle da epilepsia é a utilização de drogas anticonvulsivantes, cerca de 47% das crises respondem ao uso de uma droga, 13% respondem à 2 drogas e 4% respondem a 3 drogas, com ainda chance de 5-10% de controle com mais de 3 drogas (Lardizabal, 2008). De acordo com o tipo de crise, a frequência e a não resposta a pelo menos 2 drogas, as epilepsias que não respondem ao tratamento são consideradas epilepsias multidrogas resistentes, epilepsia farmacorresistente ou simplesmente refratárias ao tratamento medicamentoso (Lardizabal, 2008; Kwan *et al.*, 2010). As epilepsias focais possuem uma baixa resposta ao tratamento medicamentoso, em torno de 40% (Lardizabal, 2008), especialmente a ELTM-EH com refratariedade em torno de 58-89% (Landazuri, 2014). Uma das teorias para resistência a medicação da TLE envolve a modificação patológica da composição das subunidades dos canais iônicos ou dos receptores de neurotransmissores (Blumcke *et al.*, 1999).

A refratariedade e a lesão estrutural localizada fizeram da remoção cirúrgica da região do foco epilético e a interrupção das vias de propagação das crises uma opção de tratamento em epilepsias focais possibilitando um controle da doença, com melhora significativa qualidade de vida do paciente e da família (Choi *et al.*, 2008; Clusmann, 2008; Sajobi *et al.*, 2014; Wiebe, 2014). A ELTM é responsável por 50 a 73% das neurocirurgias funcionais para controle das crises (Tellez-Zenteno e Hernandez-Ronquillo, 2012). A cirurgia apresenta um controle de crises de 60-70% em 2 anos e 50% em 10 anos (Cendes *et al.*, 2014). Em alguns casos o estabelecimento do diagnóstico e a perspectiva de melhor prognóstico e incremento na qualidade de vida direciona o paciente inicialmente ao procedimento cirúrgico, sem a tentativa de controle medicamentoso inicial (Kwan e Sperling, 2009; Noachtar e Borggraefe, 2009; Ramey *et al.*, 2013).

Para a indicação do procedimento cirúrgico uma série de exames (vídeoeletroencefalograma, ressonância magnética (RM), tomografia computadorizada por emissão de foto único (SPECT), RM integrada à SPECT (SISCOM), eletroencefalograma de superfície e eletrocorticografia, magnetoencefalografia, injeção intracarótida de anestésico para avaliação com anestesia hemisférica (teste de Wada) e avaliação neuropsicológica, entre outros) são solicitados, de acordo com sua necessidade, para se confirmar a doença e a

lateralização das crises, bem como se avaliar a técnica cirúrgica a ser utilizada e a relação entre a região a ser ressecada e as estruturas anatomofuncionais a serem preservadas (Kilpatrick *et al.*, 2003; Bote *et al.*, 2008; Clusmann, 2008; La Fougere *et al.*, 2009; Noachtar e Borggraefe, 2009; Malmgren e Thom, 2012; Ramey *et al.*, 2013).

Mesmo considerando o grau de sucesso da cirurgia para controle da ELTM, não se pode negar os múltiplos riscos inerente são procedimento neurocirúrgico como um todo ou a técnica cirúrgica empregada: infecção, com risco aumentado na necessidade de monitoramento invasivo, entre 1-12%; hematoma e infarto entre 1-2%; déficits motores, aproximadamente 2%; déficits visuais de maior gravidade em 4-12%; lesão de nervos cranianos, geralmente temporária do oculomotor (III nervo craniano) e o troclear (IV nervo craniano) entre 1,5-3% e por fim risco a déficits de linguagem, memória e cognição, que devem ser avaliados caso a caso (Sasaki-Adams e Hader, 2008; Kwan e Sperling, 2009; Cendes *et al.*, 2014).

A cirurgia na ELTM baseia-se na retirada da região envolvida na geração das crises, incluindo principalmente as estruturas mesiais, como hipocampo, amígdala basolateral, córtex entorrinal e giro para hipocampal, podendo apresentar ampliação ou diminuição da área a ser ressecada, incluindo o neocórtex lateral, de acordo com as avaliações pré-cirúrgicas e a evidencia de seus envolvimento na geração e propagação das crises (Mintzer e Sperling, 2008; Ramey *et al.*, 2013).

A falha cirúrgica pode ocorrer pela ressecção insuficiente das áreas envolvidas, na existência de outros focos além do retirado ou pelo surgimento de um novo foco. Este último normalmente gerado junto ao processo de epileptogênese anterior, com grande incidência nas estruturas límbicas contralaterais ao ressecado. Novamente, se faz necessário ampliar o conhecimento das redes e circuitos neuronais envolvidos para ampliar o sucesso cirúrgico (Bertram, 2003; Noachtar e Borggraefe, 2009; Harroud *et al.*, 2012).

A evolução das técnicas neurocirúrgica acompanha o entendimento da evolução da ELTM e das estruturas envolvidas como mostra historicamente as evoluções ocorridas das técnicas pioneiras como a lobectomia temporal anterior propostas por Falconer (1953) (Elsharkawy *et al.*, 2011) e a técnica da amigdalohipocampectomia, introduzida pelo neurocirurgião brasileiro Paulo Niemeyer Soares (1958) e modificada por Yasagil (1985) (Isolan *et al.*, 2007; Adada, 2008; Binder e Schramm, 2008; Wheatley, 2008). Mesmo com os poucos dados avaliando diretamente as diferentes abordagens, os estudos não demonstram diferenças significativas quanto ao controle das crises, porém com possíveis melhores

resultados neuropsicológicos nas abordagens mais seletivas (Schramm, 2008; Malikova *et al.*, 2014; Jobst e Cascino, 2015; Wendling *et al.*, 2015).

A busca de técnicas que preservem maior tecido cerebral normal, e consequente funções fisiológicas das estruturas preservadas (Clusmann, 2008; Bujarski *et al.*, 2013), é uma tendência histórica a ser mantida com o aprimoramento da neurocirurgia e da epileptologia (Gross *et al.*, 2015). Outras técnicas menos invasivas como a cirurgia esterotática por radiofrequência ou a laser, ou radiocirurgia com “*Gamma Knife*” são técnicas utilizadas como exceção e não possuem dados de segurança que demonstrem benefícios em relação a cirurgia convencional (Malikova *et al.*, 2010; Kawamura *et al.*, 2012; Vale *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2013; Gross *et al.*, 2015).

Por trás do planejamento da ressecção cirúrgica e do controle eficiente das crises está o entendimento das modificação neuronal nestas estruturas, suas alterações funcionais (Mcnamara, 1994; Engelborghs *et al.*, 2000; Ure e Perassolo, 2000; Yaari e Beck, 2002; Avanzini e Franceschetti, 2003; Avoli *et al.*, 2005; Pitkanen e Lukasiuk, 2009; Pitkänen e Engel Jr, 2014) e de conectividade (Caciagli *et al.*, 2014; Tracy e Doucet, 2015), modificadas temporalmente no processo de epileptogênese e ictogênese, de forma a delimitar a zona epileptogênica (Luders *et al.*, 2006).

O conceito de zona epileptogênica como “a área cortical mínima a ser ressecada (inativada ou completamente desconectada) para não produzir mais crises”(Luders *et al.*, 2006), deve ser ampliado para abarcar as modificações estruturais e moleculares, incluindo a variação temporal, da zona epileptogênica (Luders *et al.*, 2006; Carreno e Lüders, 2008; Engel Jr, 2008). Esta contínua ampliação de conceito é uma consequência dos avanços na epilepsia já considerado na criação do próprio conceito da zona epileptogênica, assim alguns entendimentos devem ser reestabelecidos: primeiro, o conhecimento que mesmo existindo vias preferenciais envolvidas na epilepsia que podem primariamente ser interrompidas e apresentar um controle temporário da crise, a manutenção de vias alternativas da zona epileptogênica permite o ressurgimento das crise; segundo, a compreensão que a zona epileptogênica supera um entendimento eletroencefalográfico, devendo ser estabelecido um entendimento de modificações moleculares não estáticas na rede neuronal responsável pela epileptogênese e ictogênese, que incluem os achados eletroencefalográficos, mas não se limita a estes, pois as diferentes zonas possuem modificações neuronais e extra-neuronais que podem não sensibilizar os exames solicitados (Luders *et al.*, 2006; Carreno e Lüders, 2008).

Esta relação entre as vias e as modificações neuronais e extra neuronais devem também serem estendidas ao entendimento dos conceitos de zona irritativa (região

responsável pelos achados eletroencefalográficos interictais), zona de início de crise (região responsável pelo início das crises clinicamente estabelecidas), zona sintomatogênica (região responsável pelas manifestações ictais de sinais e sintomas), lesão epileptogênica (lesão macroscópica envolvida na geração das crises) e zona de déficit funcional (área com diminuição de funcionamento durante período ictal) para se entender o substrato estrutural e molecular envolvido nestas áreas, e a interação entre elas (Luders *et al.*, 2006; Arzimanoglou e Kahane, 2008; Baumgartner e Lehner-Baumgartner, 2008; Carreno e Lüders, 2008; Eccher e Nair, 2008; Hamer e Knake, 2008; Kellinghaus e Lüders, 2008).

A relação entre a teoria e prática entre todas estas definições se faz mais frágil quando na prática clínica o monitoramento intracraniano não possui uma resolução capaz de localizar a região exata da estrutura geradora ou encontra múltiplos focos ictais, estimando regiões amplas de início de crise. Estudos animais se somam a estes achados ao demonstrarem em múltiplas estruturas (hipocampo, córtex entorrinal, amígdala e córtex olfatório) neurônios epileptogênicos, com períodos prologando de despolarização quando estimulados, com múltiplos potenciais de ação sobrepostos mas não localizáveis em avaliações clínicas para delimitar uma zona epileptogênica efetiva. Achados em outros tipos de epilepsia colocam a possibilidade do circuito iniciador da crise não ser o responsável pela modulação de início da crise, algo que poderia resignificar a função talâmica na ELTM e modificar significativamente o entendimento e o tratamento desta doença (Bertram, 2009). A limitação sem critérios aos achados de exames ou a resolução das tecnologias empregadas podem gerar armadilhas subjetivas nos resultados, afinal a relação da zona epileptogênica e das demais 5 zonas é muito variável (Arzimanoglou e Kahane, 2008; Carreno e Lüders, 2008; Klein e Rosenow, 2008).

O entendimento estrutural e molecular da zona epileptogênica e de sua subordinação à zona irritativa, permitirá uma diferenciação precisa entre “espículas verdes” e “espículas vermelhas”, da diferenciação da zona de início de crise e da potencial zona de crise, e de sua localização atual na zona epileptogênica ou na zona irritativa (Luders *et al.*, 2006; Arzimanoglou e Kahane, 2008; Carreno e Lüders, 2008).

A possível localização de assinaturas estruturais e moleculares destas áreas e seus limites ou sobreposições poderá propiciar, além de maior efetividade e segurança na abordagem cirúrgica (Carreno e Lüders, 2008), terapias alvos capazes de controlar as crises, sem a necessidade de uma cirurgia (Kemp e McKernan, 2002; Kalia *et al.*, 2008; Cully, 2014; Zhu e Paoletti, 2015), ou mesmo de acopladas a nanopartículas magnetizadas permitir visualizar junto a ressonância magnética os limites da zona epileptogênica (Engel Jr, 2008).

Além das zonas envolvidas nas crises se faz necessário entender o que leva as modificações estruturais que irão formar a rede neuronal formadora de crise, o fator iniciador da epileptogênese.

Um padrão de predisposição genética pode estar associado a um possível dano iniciador (Engel, 1996). Um número significativo de pacientes com ELTM-EH, acima de 87%, apresentaram critérios deste fator, sendo este uma convulsão febril na infância (47%), trauma cranioencefálico (10%), trauma ao nascimento (19%) ou status epiléptico (15%) (Curia *et al.*, 2014). O risco de apresentar doença em pessoas que apresentaram uma crise convulsiva febril é 10 vezes maior que na população em geral (Landazuri, 2014).

Modificações neuronais intrínsecas (tipos de receptores, modificações na composição de suas subunidades, número e distribuição de receptores, ativação de segundos mensageiros e modulação da expressão gênica) e extrínsecas (concentração iônica do meio, remodelamento sináptico, modulação do metabolismo do neurotransmissor pelas células gliais) são necessárias para transformar as redes neurais normais em hiperexcitáveis (epileptogênese) e geradoras de crises (ictogênese) (Engelborghs *et al.*, 2000; Silva e Cabral, 2008). O entendimento das modificações são essenciais para se estabelecer o tratamento mais adequado de acordo com as modificações já ocorridas junto a este circuito, sendo ele farmacológico ou cirúrgico (Bertram, 2009), bem como para se possibilitar uma identificação clara do motivo desencadeador das mudanças, prevenção da instalação da epilepsia e possíveis alvos terapêuticos (Cendes *et al.*, 2014; Curia *et al.*, 2014).

O rearranjo dos mecanismos inibitórios e excitatórios é claramente um dos nós críticos do mecanismo da epilepsia, conhecido a tempos, com significativo papel dos receptores glutamatérgicos, em especial os da família de receptores preferencialmente ativados por N-metil-D-aspartato (NMDAr) e das vias Gabaérgicas, com destaque ao receptor ativado pelo ácido Gamma-aminobutírico tipo A (GABA_AAr) (Mcnamara, 1994; Armijo *et al.*, 2005), mas também com novas possibilidades de vias excitatórias e inibitórias com a epilepsia, como a implicação do receptor glutamatérgico preferencialmente ativado por ácido caínico ou cainato, em inglês “Kainate” (KAr), com a epilepsia de ausência juvenil, com a mutação na subunidade GluK1 (Armijo *et al.*, 2005); e como a ativação do receptor de neuropeptídeo Y (NPYr) suprimindo a atividade epileptiforme e diminuindo a excitabilidade em modelos de epilepsia (Avoli *et al.*, 2005).

Na ELTM assim como o envolvimento hipocampal está estabelecido, as alterações nos NMDAr e GABA_AAr também são encontradas nestes hipocampus, tanto em humanos e como modelos animais, que evidenciam modificações de composição destes

receptores (Avoli *et al.*, 2005), podendo estas alterações estar presentes em outras estruturas extra-hipocâmpais, como a amígdala.

1.2 Amígdala na ELTM

A amígdala, ou complexo amigdalóide, é uma estrutura do lobo temporal, nomeada devido ao formato de amêndoa, composta por um complexo heterogêneo de aproximadamente 13 núcleos, de acordo com sua organização e citoarquitetura. Apesar das controvérsias, minimamente, a amígdala pode ser dividida em dois complexos principais: basolateral (incluindo os núcleos lateral, basolateral e basomesial) que concentra importante relação com o hipocampo e córtex entorrinal; e o complexo centromedial (incluindo o núcleo central e massas celulares intercaladas) que apresenta projeções vindas do hipotálamo e tronco cerebral (Pitkanen *et al.*, 1998; Ledo-Varela *et al.*, 2007; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008). O acompanhamento da evolução cortical do cérebro humano em relação as outras espécies apresenta no aumento proporcional do núcleo basolateral em relação ao centromedial evidência da importância a ser considerada no estudo da amígdala e de suas relações funcionais e patológicas (Janak e Tye, 2015).

O papel da amígdala na compreensão da modulação de processos cognitivos, principalmente medo, emoção e a memória não declarativa, colocam a amígdala como uma estrutura chave no reconhecimento visual e auditivo das emoções, na valência e intensidade destas, no condicionamento comportamental Pavloviano, na motivação, afetividade, na relação social, entre outras funções (Moses *et al.*, 2002; Heimer e Van Hoesen, 2006; Ledo-Varela *et al.*, 2007; Olson *et al.*, 2007; Valente e Busatto Filho, 2013; Duvarci e Pare, 2014; Benarroch, 2015; Janak e Tye, 2015)

Estudos relacionam o envolvimento da amígdala na gênese da depressão, ansiedade, transtorno bipolar, psicose, esquizofrenia, autismo e demências, associadas a alterações funcionais e volumétrica desta estrutura. Em vista a frequência de algumas destas doenças ou traços destas junto aos pacientes com ELTM, os achados podem representar a interligação entre estas doenças e seus substratos neuronais (Ledo-Varela *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2008; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008; Valente e Busatto Filho, 2013; Benarroch, 2015).

A associação entre amígdala e epilepsia, bem como da amígdala com a ELTM, é cerca de 100 anos mais moderna que o questionamento de Bouchet e Cazauvieilh (1825) da relação entre hipocampo e epilepsia. Por volta de 1950, após achados de Brockhaus (1938) e Falconer e colaboradores (1964) em autópsias com pacientes que morreram após status epiléptico, a reprodução semiológica da crise límbica com a estimulação da amígdala por Feindel e Penfield (1954) e Penfield e Jasper (1954) (Pitkanen *et al.*, 1998).

A amígdala possui um conjunto de tratos de entrada do córtex frontal e temporal e de saída para o sistema extrapiramidal, córtex e hipocampo, dentre outras regiões, que torna obrigatório o estudo do seu envolvimento na elucidação de mecanismos de propagação das atividades epiléticas localizadas no lobo temporal e generalizações das crises (Pitkanen *et al.*, 1998; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008).

Achados como aura com sensação de medo, prolongado período de confusão pós-ictal (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008), aumento do componente tônico das crises, generalização no início de crise, auras olfatórias estão relacionadas ao envolvimento da amígdala na geração de crises, sem outras grandes diferenças na semiologia das crises na ELTM em geral, não sendo evidenciado a correlação da zona de início ictal amigdaliana com outros achados semiológicos como automatismos oroalimentares e gestuais ou outros tipos de auras (Du *et al.*, 2015).

Os núcleos amigdalianos possuem complexas relações intrínsecas que podem estar ligadas, além da sua grande capacidade de processamento de informação, a geração do foco epiléptico. Evidências que corroboram com esta teoria, cerca de 5-20% dos pacientes com ELTM tem seu foco iniciador de crise localizado junto a esta estrutura; de 10-57% dos pacientes apresentam redução volumétrica da amígdala em imagem; aproximadamente 10% de achados de esclerose ou redução de volume são exclusivos na amígdala; até 14% de pacientes possuem como achado exclusivo a hipertrofia da amígdala, sendo sugerindo por alguns autores evidências para caracterização deste grupo como um subtipo de ELTM sem EH, a ELTM amigdaliana (Miller *et al.*, 1994; Pitkanen *et al.*, 1998; Ledo-Varela *et al.*, 2007; Al Sufiani e Ang, 2012, Lv *et al.*, 2014; Benarroch, 2015). Achados cirúrgicos também corroboram com esta teoria uma vez que a retirada exclusiva da amígdala pode gerar controle adequado de crises (Wieser, 2000; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008).

Relativo a lesão estrutural, gliose e perda neuronal é evidenciada em maior intensidade junto ao núcleo basolateral, sendo os achados equivalentes aos encontrados na estrutura hipocampal (Pitkanen *et al.*, 1998). A interrelação encontrada no controle de crises com remoção exclusiva de amígdala ou hipocampo, realizados nos anos 90, demonstra

controle de crises em valores semelhantes em ambos casos, em torno de 60%, pouco inferior os valores de retirada simultânea das duas estruturas, demonstrando a importância de ambas na ELTM (Schramm, 2008).

Modelos experimentais em animais, utilizando pilocarpina, ácido caínico e em especial, de excitação elétrica (“*kindling*”) da amígdala (Cavazos e Cross, 2006; Bertram, 2007; Majores, Michael *et al.*, 2007; Pitkanen *et al.*, 2007; Scharfman e Gray, 2007) reforçam a importância da amígdala como foco iniciador e propagador das crises, sendo sua estimulação mais eficaz que o hipocampo, gerando alterações ictais e interictais e achados estruturais, como a esclerose hipocampal, de forma semelhante a ELTM (Bertram e Scott, 2000; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008).

Assim como no hipocampo, estudos em animais evidenciaram diminuição de neurônios gabaérgicos no núcleo basolateral ipsilateral e contralateral, evidenciando o papel da neurotransmissão inibitória na amígdala (Pitkanen *et al.*, 1998; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008)

Modelos animais com injeção de ácido caínico, apresentam evidência de morte celular nos neurônios amigdalianos pela excitotoxicidade glutamatérgica (Pitkanen *et al.*, 1998; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008), enquanto o tratamento com antagonista NMDA pode prevenir as crises provocadas por “*kindling*”, por inibição da epileptogênese após o insulto inicial e pode controlar as crises (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008).

É necessária maior elucidação do papel da amígdala na ELTM e da equivalência dos achados experimentais na ELTM entre amígdala e hipocampo (Bertram *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2007; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008).

1.3 Neurotransmissores na ELTM

A partir da década de 1950, quando Hayashi reportou a neuroexcitabilidade do Glutamato (Meldrum, 2000) e Florey descobriu o “Fator I”, que mais tarde ficou conhecido como o neurotransmissor GABA (ácido γ -aminobutírico) (Snodgrass, 1992), o entendimento sobre estes neurotransmissores (excitatórios e inibitórios), seus papéis fisiológicos e patológicos, especialmente em epilepsia tem sido crescente e estimulando novas pesquisas.

O desequilíbrio entre mecanismos excitatórios e inibitórios pode ser analisado como fator de alteração do controle de vias de ativação e inibição de grupos neuronais ou na

modificação do potencial de ação celular, incluindo mecanismos de hiperexcitabilidade, tendo nos receptores e canais iônicos celulares seus principais responsáveis (Dichter e Ayala, 1987; Brooks-Kayal, 2005; Serdyuk *et al.*, 2014).

Este desequilíbrio é alterado de forma gradual e pode possuir diferentes características temporais, com estudos em modelos sugerindo dois estágios mais claros, um inicial inibitório e um posterior excitatório (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008), podendo se relacionar com as diferenças na organização estrutural da epileptogênese e posterior ictogênese.

Mesmo as alterações morfológicas e funcionais do hipocampo sendo as mais estudadas (Volcy-Gómez, 2004; Leite *et al.*, 2005; Cavazos e Cross, 2006; Andrade-Valença *et al.*, 2008), muitas perguntas continuam sem respostas. Um direcionamento necessário é ampliar o conhecimento das alterações de neurotransmissores e receptores NMDA e GABA em estruturas extra-hipocámpais (Sierra-Paredes e Sierra-Marcuno, 2007; Yuan *et al.*, 2015), sendo a amígdala umas das estruturas mais promissoras, somando todos os fatores já elencados até aqui às similaridades apresentadas nas análises histológicas em humanos dos tecidos hipocámpais e amigdalianos (Fujikawa e Itabashi, 1994; Miller *et al.*, 1994; Cendes *et al.*, 1995).

1.4 Receptor NMDA - Neurotransmissão Excitatória

O NMDAr, fisiologicamente se mostra como um dos receptores excitatórios mais importantes, com grande e difusa distribuição no cérebro, associado a extrema importância no sistema límbico junto a plasticidade funcional envolvida no aprendizado e na memória (Paoletti *et al.*, 2013), podendo esta base estrutural e molecular estar modificada na reestruturação das vias epileptogênicas, principalmente na ELTM (Sanz-Clemente *et al.*, 2013).

O receptor de membrana NMDAr é caracterizado pelo seu canal catiônico que exemplifica a base da transmissão sináptica, com a entrada de íons sódio, potássio e principalmente cálcio, despolarizando a célula, ativando fosfatases e quinases, alterando então a maquinaria celular neuronal. A estequiometria mais aceita é a organização em tetrâmeros, com dois dímeros de subunidades com funções diferentes, que apresentam particularidades funcionais de ativação, co-ativação do canal, possibilitando em suas diversas composições e

rearranjos de subunidades uma grande variabilidade nas funções fisiológicas e potenciais possibilidades de modificações nos mecanismos patológicos, produzindo alterações funcionais que se relacionam com diferentes cinéticas de despolarização e repolarização, ativação de cascatas de sinalização e consequente diversidade de alterações nos circuitos neuronais (Cavara *et al.*, 2009; Traynelis *et al.*, 2010; Frank, 2011; Marmioli e Cavaletti, 2012; Sanz-Clemente *et al.*, 2013; Glasgow *et al.*, 2015).

Outra característica do receptor NMDAR é o bloqueio voltagem dependente pelo íon Magnésio, impedindo a abertura do poro até que a célula seja previamente despolarizada (Marmioli e Cavaletti, 2012; Glasgow *et al.*, 2015).

A forma mais comum de se encontrar o receptor NMDAR é com uma das subunidades nos dímeros sendo a NR1. Esta possui oito formas ou “splittings” alternativos, NR1-1a,1b, NR1-2a,2b, NR1-3a,3b, ou NR1-4a,4b, responsável pelo sítio de ligação a glicina, co-agonista deste receptor junto com D-serina ou poliaminas, codificada pelo gene GRIN1 (Traynelis *et al.*, 2010; Glasgow *et al.*, 2015). São menos conhecidas as propriedades das diversas formas desta subunidade sobre o canal, mas estudos mostram que elas podem influenciar no tempo de ativação, no bloqueio do canal por mudanças de pH e na sensibilidade aos prótons e ao zinco (Cull-Candy *et al.*, 2001).

Achados de aumentos isolados da subunidade NR1 por métodos moleculares exigem uma ampliação da investigação para melhor elucidação do significado funcional (Kikuchi *et al.*, 1996; De Moura *et al.*, 2012), estes achados demonstram que a subunidade NR1 isolada não forma um receptor funcional. Achados propõem seu envolvimento de montagem do tetrâmero no retículo endoplasmático, antes da expressão de novos receptores para a membrana (Atlason *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Schuler *et al.*, 2008), podendo estes NR1 estarem organizados junto à população destas subunidades retidas no retículo endoplasmático (Stephenson, 2006; Sanz-Clemente *et al.*, 2013).

As variantes eletrofisiológicas e farmacológicas do receptor NMDA se devem as diferentes subunidades da família NR2 (NR2A, NR2B, NR2C e NR2D), que possuem o sítio de ligação do receptor do glutamato (Sanz-Clemente *et al.*, 2013; Glasgow *et al.*, 2015). As subunidades NR3A e NR3B podem formar tanto um receptor sensível a glicina e glutamato, quando montada em dímeros com NR2, como um receptor de glicina, quando montada em dímeros com NR1. Ainda são encontrados arranjos de receptores contendo subunidades NR1/NR2/NR1/NR3 (Glasgow *et al.*, 2015) e NR1/NR2(X)/NR1/NR2(Y) (Stephenson, 2006; Frank, 2011; Paoletti *et al.*, 2013), porém ainda não está clara sua representatividade e propriedades.

Estruturalmente é possível dividir as propriedades das subunidades NR2 relacionadas ao domínio N-terminal extracelular, sendo estas, referentes a abertura e fechamento do canal, e às propriedades do sítio de ligação; e as relacionadas ao domínio transmembrânico, com a modificação das propriedades do canal. Como a modificação do sítio transmembrânico é controlada por um resíduo único, similar entre 2A/2B e 2C/2D, estes possuem a mesma sensibilidade a magnésio, permeabilidade a cálcio e condutância (Glasgow *et al.*, 2015).

Em relação à funcionalidade, as subunidades NR2 seriam responsáveis pela manutenção da despolarização junto aos paroxismos despolarizantes dos neurônios epileptogênicos, com uma entrada lenta de cálcio na célula, é atribuída a este receptor (Armijo *et al.*, 2000). Em displasia cortical, estudos demonstraram um aumento das subunidades NMDA-NR2 nas regiões focais (Babb *et al.*, 1998; Ying *et al.*, 1999; Najm *et al.*, 2000).

Fatores como o tempo de abertura do canal sendo NR2D>>NR2C=NR2B>NR2A (Wang e Jensen, 1996; Cull-Candy *et al.*, 2001; Sanz-Clemente *et al.*, 2013; Glasgow *et al.*, 2015), o pico de corrente NR2A>NR2B>NR2C=NR2D (Wang e Jensen, 1996; Glasgow *et al.*, 2015), sensibilidade ao zinco NR2A>NR2B>NR2C=NR2D (Glasgow *et al.*, 2015), sensibilidade ao bloqueio de magnésio NR2A=NR2B>NR2C=NR2D (Wang e Jensen, 1996; Glasgow *et al.*, 2015), permeabilidade a Ca⁺⁺ NR2A=NR2B>NR2C=NR2D>NR3A ou NR3B (McIlhinney *et al.*, 2003; Paoletti e Neyton, 2007), podem caracterizar, por exemplo, uma forma diferenciada na ictogênese ou na epileptogênese, ou mesmo nas zonas irritativa, ictogênica e epileptogênica (Rosenow e Luders, 2001), bem como refletir modificações temporais em decorrência das crises (Bragin *et al.*, 2000; Yaari e Beck, 2002).

As subunidades NR3A são encontradas em maior quantidade no cérebro em desenvolvimento, mantendo a expressão em poucas regiões no cérebro adulto, estando expressa em retina, tálamo e amígdala de ratos, e em hipocampo, amígdala, tálamo, hipotálamo, neocórtex e cerebelo de macacos (Cavara e Hollmann, 2008).

Em relação ao “*kindling*”, mudanças de sensibilidade ao bloqueio de magnésio são associadas em alteração na composição de subunidades deste receptor (Armijo *et al.*, 2005), enquanto a resistência a geração de crises está associada a subunidade NR2D, por possuir uma menor afinidade ao NMDA e menor condutância (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008).

Em hipocampus de pacientes com ELTM foi constatado aumento das subunidades NR1 e NR2B e diminuição da NR2A, sendo compatível com estudos eletrofisiológicos que indicavam um aumento da condutância dos NMDAr (Avanzini e Franceschetti, 2003).

Em modelo animal de crises neonatais em ratos para análise de efeito de longo prazo houve redução da expressão NR2A e aumento de NR2C no hipocampo, apenas no grupo com crises recorrentes (Bo *et al.*, 2004). Estudos em modelo animal de esclerose tuberosa demonstraram aumento da expressão da NR2C e controle de crises com uso de antagonista seletivo de NR2C/D. A complementação experimental eletrofisiológica com tecido humano de pacientes com esclerose tuberosa, com achado de expressão de NR2C aumentada, e displasia focal demonstrou controle dos disparos neuronais, implicando na importância desta subunidade no mecanismo de epileptogênese e ictogênese nestas epilepsias (Lozovaya *et al.*, 2014).

Na análise das diferentes montagens do NMDAr, as subunidades NR2 e NR3 são os principais alvos de estudo pelo seus importantes papéis no desenvolvimento neuronal, neurotoxicidade, plasticidade sináptica (Meldrum, 2000; Genoux e Montgomery, 2007; Li *et al.*, 2007), podendo estes estudos auxiliarem na pesquisa em epilepsia (Ying *et al.*, 1999; Cull-Candy *et al.*, 2001; Genoux e Montgomery, 2007; Paoletti *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2015).

O NMDA se encontra associado a uma rede de proteínas, como as PSD-95 e MAGUK (guanilato-quinase associada à membrana) que regulam, entre outras, sua ativação, expressão na membrana celular e modulação da sinalização celular (Stephenson, 2006; Bard e Groc, 2011; Fan *et al.*, 2014). Estas podem também ter papel significativo junto à epilepsia e em seus mecanismos patológicos ou terapêuticos (Schrattenholz e Soskic, 2006).

1.5 Receptor Cainato – Neurotransmissão Excitatória

O Receptor Cainato (KAr) é um receptor glutamatérgico ionotrópico, menos comum e menos estudados que as outras famílias de receptores de glutamato, mas que deve ser levado em consideração na elucidação dos mecanismos epileptogênicos (Lerma, 2006; Matute, 2011; Lerma e Marques, 2013; Carta *et al.*, 2014; Crepel e Mulle, 2015).

Este receptor tetamérico possui uma semelhança funcional com o receptor glutamatérgico mais sensível ao ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

(AMPAr) (Marmioli e Cavaletti, 2012), tendo potencial no envolvimento na geração dos paroxismos despolarizantes dos neurônios epileptogênicos, sendo estes os dois possíveis iniciadores da despolarização nos neurônios epileptogênicos (Armijo *et al.*, 2000).

As propriedades de ativação do KAr, desensibilização e permeabilidade são alteradas de acordo com o arranjo entre os seus 5 tipos de subunidades (GluK1 ou GluR5, GluK2 ou GluR6, GluK3 ou GluR7, GluK4 ou KA1, GluK5 ou KA2), codificadas respectivamente pelos genes GRIK1-5 (Perrais *et al.*, 2010; Contractor *et al.*, 2011; Marmioli e Cavaletti, 2012), apresentando ainda suas formas variantes alternativas (Pahl *et al.*, 2014). A formação mais encontrada deste receptor é em tetrâmero, formado por homômeros entre as GluK1, GluK2 e GluK3, ou subunidades GluK4 ou GluK5 expressos em conjunto com GluK1 à GluK3 (Traynelis *et al.*, 2010).

Os setores vulneráveis à perda neuronal e gliose do hipocampo são ricos em cainato, podendo a diminuição celular característica da esclerose hipocampal estar envolvida na morte celular por influxo acentuado de cálcio durante a ativação destes receptores nas crises (Cendes *et al.*, 2014).

GluK1, GluK2 e GluK5 são encontrados em amígdala de rato, principalmente nos núcleos basolateral e medial, sugerindo o envolvimento dos receptores GluK1, em maior quantidade nesta estrutura, na geração de atividade epiléptogênica da amígdala (Braga *et al.*, 2004). Modelos animais que utilizam o ácido cálnico, apresentam evidente atividade ligada a este tipo de receptor (Epsztein *et al.*, 2005; West *et al.*, 2007). A unidade GluK1 está aumentada em hipocampus de pacientes com ELTM e em modelos animais, antagonistas da subunidade GluK1 bloqueiam a atividade epileptiforme (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2007; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008; Matute, 2011; Crepel e Mulle, 2015). Outros estudos em modelos animais de ELTM sugerem que GluK2, especialmente o receptor montado com as unidades GluK2/GluK5, está envolvido nesta doença e poderá ser um promissor alvo terapêutico (Matute, 2011; Peret *et al.*, 2014; Crepel e Mulle, 2015).

1.6 Receptor GABAA – Neurotransmissão Inibitória

O receptor ativado pelo ácido Gamma-aminobutírico tipo A (GABA_Ar) é o mais importante na neurotransmissão inibitória do sistema nervoso central (Stephenson, 2006), com cerca de 500 tipos diferentes deste receptor dentre os aproximadamente 20% dos

neurônios cerebrais que são gabaérgicos, entre suas principais funções está controlar a excitabilidade cerebral e modular as funções cognitivas, de memória e aprendizado (Sieghart, 2006), associado também as correntes rápidas de hiperpolarização dos neurônios epileptogênicos (Armijo *et al.*, 2000).

A estrutura pentamérica do GABA_AR é organizada a partir de 5 subunidades dentre os 19 diferentes tipos de subunidades (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ , ρ 1-3), formando um canal iônico permeável a cloreto, com características farmacológicas e eletroquímicas diferenciadas de acordo como arranjo de subunidades. A ativação se dá por agonistas, como o GABA, sendo modulada por benzodiazepínicos, ou outras substâncias que interajam com este sítio de ligação. A montagem mais comum encontrada no sistema nervoso central a α 1 β 2 γ 2 α 1 β 2, com predomínio de variantes com substituição de α ou β , ou tendo a subunidade γ substituída por δ , ou ainda ϵ e π (Sieghart, 2006; Stephenson, 2006; Belelli *et al.*, 2009; Luscher *et al.*, 2011).

Evidências reconhecem relações entre os GABA_AR e epilepsia (Macdonald *et al.*, 2010; Avoli e De Curtis, 2011; Yuan *et al.*, 2015). Mutação nos genes das subunidades α 1, β 3 e γ 2, estão relacionadas a causas genéticas de epilepsia (Mulley *et al.*, 2003).

A diminuição dos neurônios gabaérgicos no hipocampo e na amígdala, também é documentada, principalmente ao envolvimento do receptor GABA_A, dentro dos mecanismos epileptogênicos das epilepsias e da ELTM, devido a facilitação da excitabilidade local (Bernard *et al.*, 2000; Majores, M. *et al.*, 2007).

Em modelos animais, agonistas do receptor GABA_A, apresentam tanto um fator protetor à geração da crise, com antagonistas destes receptor gerando efeitos semelhante ao “kindling”, quanto controlador das crises em animais submetidos a “kindling”, sugerindo seu papel tanto na epileptogênese quanto na ictogênese (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008). Em modelo animal, mudanças agudas e crônicas na composição de subunidades são demonstradas experimentalmente pelo aumento de sensibilidade a zinco dos receptores GABA_A, podendo ser explicado pela diminuição da expressão da subunidade α 1 e aumento da α 4 (Blumcke *et al.*, 1999), ou diminuição das subunidades α 1 e γ 2 (Shumate *et al.*, 1998).

Em modelo animal utilizando ácido cáinico, é evidenciado uma redução dos neurônios gabaérgicos no núcleo basolateral da amígdala, com aumento da expressão da subunidade α 1 e diminuição de GluK1, com aumento da subunidade α 1 no hipocampo e diminuição não significativa de GluK1 (Fritsch *et al.*, 2009).

Mecanismos envolvendo o arranjo de subunidades do receptor com diferentes subunidades, modificam a cinética e a resposta às drogas, podendo estar relacionados na resistência a medicamentos anti-epilépticos (Sieghart, 2006). Em modelos por “*kindling*” a menor sensibilidade aos benzodiazepínicos está associada a diminuição das unidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 5$ com aumento de $\alpha 4$ e $\alpha 6$ (Armijo *et al.*, 2005).

Estudos com agonista inverso não-seletivo para incremento da memória direcionado a subunidade $\alpha 5$ apresentou além do incremento de memória um mecanismo ansiogênico e convulsivante limitado ao seu uso (Moult, 2009).

1.7 Receptor de NPY – Neurotransmissão Inibitória

Descoberto em 1982 o neuropeptídeo Y se encontra em grande quantidade no cérebro, incluindo hipocampo e amígdala, e dentre as inúmeras funções que ele desempenha se encontra a de modulação da excitabilidade neuronal, de anticonvulsivante e de neuroprotetor (Deborah Lin *et al.*, 2006), podendo estar envolvido na epileptogenicidade da amígdala (Colmers e El Bahh, 2003; Eva *et al.*, 2006).

O NPYr possui 5 subtipos (Y1, Y2, Y4, Y5 e Y6), sem evidências que comprovem ainda o Y3 (Michael *et al.*, 1998), fazendo parte dos receptores acoplados a proteína G, sendo mais comum a expressão dos receptores Y1, Y2 e Y5 no sistema nervoso central humano (Baraban, 2004), sendo Y1 e Y2 expressos no hipocampo (Furtinger *et al.*, 2001; Deborah Lin *et al.*, 2006).

O NPYr é amplamente encontrado no núcleo basolateral da amígdala normal, tendo sua expressão modificada na epilepsia (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008). A inibição neuronal, produzida pelo aumento da concentração de neuropeptídeo Y (Ledri *et al.*, 2011) ou maior expressão de NPYr (Noe *et al.*, 2008), sugere a relevância de sua atividade no controle da epileptogênese.

Estudos demonstram que a co-expressão permite a heterodimerização entre os receptores Y1 e Y5, alterando suas características funcionais como receptores isolados (Gehlert *et al.*, 2007).

Em hipocampus de pacientes com ELTM com EH, a ampliação da expressão de Y2 e diminuição de Y1 é proposto como um fenômeno protetor, para controle das crises. Estes achados não são evidenciados em ELTM sem EH (Furtinger *et al.*, 2001; Avoli *et al.*,

2005), mas evidenciando o potencial terapêutico junto a estes receptores (Meurs *et al.*, 2007; Clynen *et al.*, 2014).

Diferentes achados em modelos animais, relacionando os subtipos específicos e o aumento ou diminuição das crises experimentalmente provocadas (Gotzsche *et al.*, 2012), evidenciando Y2 e Y5 como subtipos protetores (Woldbye *et al.*, 2005; Woldbye *et al.*, 2010), e uma função dúbia ao Y1 (Deborah Lin *et al.*, 2006), devem ser criteriosamente considerados para serem transpostos como relevantes ou equivalentes aos da ELTM humana, necessitando de estudos em tecidos humanos que demonstrem estas correlações (Niittykoski *et al.*, 2004).

1.8 A importância dos estudos com tecido de amígdala humano

Modelos animais agregam ao entendimento da ELTM em relação a evolução das modificações estruturais – período de latência – e eventos desencadeadores, que levam a posterior produção e descontrole das crises, a análise de espécimes humanos permite estudo em uma fase mais tardia das modificações estruturais, características por um complexo de modificações agregadas e com especificidades impossíveis de serem trabalhadas em modelos animais, fundamentais para a proposta de uma intervenção tardia eficaz, agregando ao entendimento fisiopatológico das estruturas envolvidas (Velísek e Moshé, 2003; Majores, Michael *et al.*, 2007; Pitkänen *et al.*, 2007; Scharfman e Gray, 2007), pode ser recomendado como sugestão a mais uma peça dentro do quebra-cabeça dos circuitos epileptogênicos (Garcia-Cairasco, 2009).

O estudo de áreas extra-hipocâmpais na ELTM são fundamentais para o entendimento desta doença, mas ainda menos numerosos, principalmente quando considerado análise de tecidos de espécimes humanos (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008; Bertram, 2009). O entendimento do grau de envolvimento e da diferenciação entre as estruturas no processo de epileptogênese e de ictogênese podem propiciar modificações no tratamento em epilepsia, sejam elas cirúrgicas, como a necessidade ou não de sua remoção (Wieser, 2000; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008; Bertram, 2009), ou farmacológicas (Kemp e Mckernan, 2002; Kalia *et al.*, 2008; Cully, 2014; Zhu e Paoletti, 2015).

Indo ao encontro de achados histológicos de pacientes e modelos animais que demonstraram compatibilidade entre as modificações em hipocampo, amígdala e córtex

entorrinal (Fujikawa e Itabashi, 1994; Miller *et al.*, 1994; Cendes *et al.*, 1995; De Lanerolle *et al.*, 2003; Squire, L. R. *et al.*, 2004; Andrade-Valença *et al.*, 2006; Al Sufiani e Ang, 2012), especialmente quanto a alterações de neurotransmissores e receptores NMDA e GABA (Sherwin, 1999; Malthankar-Phatak *et al.*, 2006), pretende-se localizar modificações na expressão gênica equivalentes em espécimes de amígdalas humanas, neste estudo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a expressão gênica das subunidades de receptores de neurotransmissores excitatórios, NMDA (NR2C e NR3A, genes GRIN2C e GRIN3A) e Cainato (GluK1 e GluK2, genes GRIK1 e GRIK2) e inibitórios GABAA (α 4 e α 5, genes GABRA4 e GABRA5), o subtipo do neuropeptídeo Y (Y2 e Y5, com genes NPY2R e NPY5R) no complexo Basolateral de Amígdala de pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM), refratária ao tratamento medicamentoso.

2.2 Objetivo Específicos:

Relacionar a diferenciação da expressão gênica dos receptores de neurotransmissores com o controle pós-operatório das crises.

Relacionar a diferenciação da expressão gênica dos receptores de neurotransmissores coma zona epileptogênica.

3. Metodologia

3.1 Casuística

Foram utilizados 20 espécimes cirúrgicos de pacientes submetidos à cirurgia funcional para controle de ELTM resistente a medicamentos, operados pela equipe cirúrgica da Disciplina de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), mediante consentimento livre esclarecido. As amostras foram armazenadas no Banco de tecidos da Neurocirurgia da FMRP/USP, de acordo com aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (Anexo 1).

O grupo controle humano foi formado por 10 espécimes de necropsias, sem anormalidades cerebrais, com tempo de morte aproximado de 5 horas, armazenados no Banco de Tecidos Congelados.

Os pacientes selecionados para o estudo tiveram suas informações relevantes as crises colhidas junto aos prontuários dos pacientes e foram divididos em 2 grupos segundo a classificação de controle de crises após cirurgia como proposto por Engel (Engel e Van Ness, 1993) composto por 10 pacientes livres de crises incapacitantes (ENGEL 1) e 10 pacientes que mantêm crises incapacitantes (ENGEL 3 e 4), de acordo com os dados clínico demonstrados nas tabela 1 e 2.

Tabela 1 - Dados clínicos dos pacientes com ELTM – Grupo 1/ENGEL 1

GRUPO 1	SEXO	LATERALIDADE	DIAGNÓSTICO PSIQUIÁTRICO	CONVULSÃO NA INFÂNCIA	INÍCIO DAS CRISES (ANOS)	FREQUÊNCIA DAS CRISES (PRÉ-CIRURGICO) (crises/mês)	TIPO DE CRISES	PERÍODO DE EPILEPSIA (Anos até cirurgia)	FREQUÊNCIA DAS CRISES (PÓS-CIRURGICO)	ENGEL
1	MASC	esquerda	-	SIM	31	14	CPC com generalização, automatismos	4	sem crises	I
2	MASC	direita	-	SIM	2	8	CPC, com automatismos	38	sem crise	I
3	FEM	esquerda	Depressão	SIM	18	4	CPC com automatismos	18	sem crises	I
4	FEM	direita	Depressão	SIM	12	1	CPC com generalização	26	sem crises	I
5	MASC	direita	-	SIM	27	3	CPC	16	sem crises	I
6	MASC	direita	-	SIM	7	4	CPC	41	sem crises	I
7	FEM	direita	Depressão	SIM	27	6	CPC com automatismos	9	sem crises	I
8	FEM	direita	Síndrome do pânico	SIM	38	1	CPC	4	sem crises	I
9	FEM	esquerda	-	SIM	1	10	CPC com generalização, automatismos	32	sem crises	I
10	FEM	esquerda	Síndrome do pânico	-	11	2	CPC com automatismos, aura afetiva	37	sem crises	I

Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes com ELTM – Grupo 2/ENGEL 3 e 4

GRUPO 2	SEXO	LATERALIDADE	DIAGNÓSTICO PSIQUIÁTRICO	CONVULSÃO NA INFÂNCIA	INÍCIO DAS CRISES (ANOS)	FREQUÊNCIA DAS CRISES (PRÉ-CIRURGICO) (crises/mês)	TIPO DE CRISES	PERÍODO DE EPILEPSIA (Anos até cirurgia)	FREQUÊNCIA DAS CRISES (PÓS-CIRURGICO) (crises/mês)	ENGEL
1	FEM	Esquerda	Transtorno de Personalidade	SIM	15	4	CPC com generalização, com automatismos	17	1	III
2	MASC	Esquerda	-	-	12	2	CPC com aura epigástrica	42	1	III
3	MASC	Esquerda	depressão	SIM	14	8	CPC com automatismos	27	3	III
4	MASC	Esquerda	-	SIM	1	10	CPC com generalização, aura epigástrica	38	1	III
5	FEM	Direita	-	-	28	4	CTCG, CPC	17	2	IV
6	FEM	Direita	depressão	-	29	1	CPC	7	1	III
7	MASC	Direita	-	SIM	7	1	CPC com generalização, automatismos	32	1	III
8	FEM	Direita	-	SIM	12	3	CPC com automatismos	21	1	III
9	FEM	Direita	depressão	SIM	20	4	CPC com aura epigástrica	23	4	IV
10	FEM	Esquerda	depressão	SIM	2	2	CPC	37	2	III

3.2 Extração de RNA, e síntese de DNA complementar (cDNA) dos genes

Após coletado o material cirúrgico ou de necropsia este é congelado em nitrogênio e adicionados 250µl de PBS (*phosphate-buffered saline*) e 750µl de *TRIzol*® (Invitrogen, EUA). Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foram acrescentados 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -20°C por pelo menos 12 horas.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Acrescentou-se então 1000µl de etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 15 minutos, a 14.000 rpm. A fase superior foi desprezada e o precipitado seco dissolvido com água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) por pelo menos 15 minutos. Esse material foi em seguida identificado e armazenado a -80°C.

Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi, ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA. Também utilizamos o espectrômico *Thermo Scientific NanoDrop 2000* para fornecer a concentração de RNA, em uma amostra de 1 a 2µl, e uma razão referente à integridade das amostras (razão 260/280). Para valores menores do que 1,6 considera-se que o material esteja degradado, e para valores maiores do que 2,0 pode ter havido interferência do clorofórmio. A faixa ideal a ser obtida é de 1,7 a 1,9, porém consideramos uma amostra boa na faixa de 1,61 a 1,99.

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial (Applied Biosystems) *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* de acordo com as instruções do fabricante

para a síntese do cDNA (DNA complementar). Para cada 1µg RNA, foi adicionado 2,5µl de RT *Buffer*; seguido de 1,0µl de dNTP's; 2,5µl *Random Primers* e 1,25µl da enzima *MultiScribeTM*, completando com água DEPC o volume final de 20µl. Em seguida o material foi levado ao termociclador nas condições padrão, onde o cDNA é sintetizado a partir do RNA das amostras.

3.3 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR-RT)

O método de PCR em tempo real é utilizado para a confirmação da expressão diferencial de genes. A partir do cDNA obtido das amostras, é realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase, tradução literal de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), quantitativa em tempo real (qPCR-RT), com a utilização do reagente *TaqMan Master Mix* (Applied Biosystems).

Para a análise quantitativa da expressão de genes, são utilizados os sistemas disponíveis comercialmente *TaqMan Assay-on-demand*, compostos por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems).

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores dos limiares de detecção (CT) determinados para as diferentes amostras, são normatizados. O CT determinado para uma amostra (para um determinado gene) é subtraído do CT determinado para um gene endógeno-controle, *house-keeping*, TBP (Hs00427620_m1) (Wierschke *et al.*, 2010; Teocchi *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2014), originando o chamado Δ CT. Os valores de Δ CT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em

diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o ΔCT de uma amostra do ΔCT do calibrador, neste caso, utilizamos a média das amostras do grupo controle, tendo como resultado $\Delta\Delta CT$. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa (“FOLD”), é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Realizamos a quantificação relativa dos genes GRIN2C (Hs01016628_m1), GRIN3A (Hs00370290_m1), GRIK1 (Hs00168165_m1), GRIK2 (Hs00222637_m1), GABRA4 (Hs00608034_m1), GABRA5 (Hs00181291_m1), NPY2R (Hs01921296_s1) e NPY5R (Hs01883189_s1) nas quais as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o reagente *Taqman Master Mix* (Applied Biosystems, EUA). A amplificação foi feita em um volume final de 10 μ l, utilizando 5 μ l do reagente específico *Taqman Master Mix*, 0,5 μ l de cada sonda específica e 4,5 μ l de cDNA. Utilizou-se um aparelho de detecção de PCR em tempo real *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems), juntamente com o *software Sequence Detection System* para a obtenção dos valores de CT. Os dados foram, então, exportados para planilhas do *software Excel* para cálculo dos valores de ΔCT .

As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas no *7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Os dados foram constantemente coletados durante o PCR e analisados em *ABI-7500 SDS “software package”*.

3.4 Estatística

Para a análise da expressão gênica pelo método quantitativo de PCR em tempo real foram calculados os coeficientes de regressão; uma transformação *log* foi aplicada para os valores de expressão dos genes para estabilização da variância. Foram calculados intervalos de confiança de 95% (IC). O *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para analisar as diferenças na expressão dos genes estudados e como pós-teste foi usado o teste de Dunn, devido as variâncias não serem homogêneas pelo teste de Bartlett. Os valores de *p* foram considerados significativos quando inferiores a 0,05.

A discrepância dos valores de um paciente do grupo 1 junto as subunidades NR2, Gluk1, Y1 e Y2 foi desconsiderada para a análise estatística, não influenciando na significância estatística encontrada entre os grupos.

4. Resultados

Analisando os resultados estatísticos sobre a expressão gênica do NMDAr, a subunidade NR2C (gene GRIN2C) evidenciou significância estatística ($p=0,006$) (gráfico1). No pós-teste a significância se mostrou apenas entre o controle e o grupo com maior controle de crises pós-cirúrgico (Engel 1).

Em relação a subunidade NR3A (gene GRIN3A) não foi evidenciada significância estatística ($p=0,077$) (gráfico2), sendo apresentada apenas uma tendência ao aumento junto ao grupo com maior controle de crises pós-cirúrgico (Engel 1).

Gráfico 1 - Análise estatística do NMDAr – NR2C (GRIN2C)

Gráfico 2 - Análise estatística do NMDAr – NR3A (GRIN3A)

As expressões gênicas das subunidades de KAr não apresentaram significância estatística, GluK1 ($p=0,147$) (gráfico 3) e GluK2 ($p=0,181$) (gráfico 4).

Gráfico 3 - Análise estatística do KAr – Gluk1 (GRIK1)

Gráfico 4 - Análise estatística do KAr – Gluk2 (GRIK2)

Os resultados para as subunidades GABA_Ar, apresentaram aumento das subunidades $\alpha 4$ em pacientes com melhor controle de crise pós-cirúrgico (Engel 1), apresentando p significativo tanto para a subunidade $\alpha 4$ ($p=0,008$) (gráfico 5). No pós-teste a significância se mostrou apenas entre o controle e o grupo com maior controle de crises pós-cirúrgico (Engel 1).

Em relação a subunidade $\alpha 5$, não foi apresentada relevância estatística ($p=0,272$) (gráfico 6).

Gráfico 5 - Análise estatística do GABA_A – $\alpha 4$ (GABRA4)

Gráfico 6 - Análise estatística do GABA_A – $\alpha 5$ (GABRA5)

Na análise dos resultados para o NPYr, é observado aumento na expressão do subtipo de NPYr Y2 em pacientes com maior controle de crise ($p=0.013$) (gráfico 7). No pós-teste a significância se mostrou entre o controle e individualmente com os 2 grupos de paciente com epilepsia.

Em relação ao subtipo de NPYr Y5 não foi evidenciada significância estatística ($p=0,147$) (gráfico 8).

Gráfico 7 - Análise estatística do NPYr Y2(NPY2R)

Gráfico 8 - Análise estatística do NPYr Y5 (NPY5R)

Os valores encontrados das expressões absolutas dos mRNAs encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 - Valores Relativos (FOLD) para as subunidades analisadas nos Grupo1/ENGEL1, Grupo2/ENGEL 3 e 4.

		NMDA		KAr		GABAA		NPYr	
		NR2C	NR3A	GluK1	Gluk2	α4	α5	Y1	Y2
		(GRIN2C)	(GRIN3A)	(GRIK1)	(GRIK2)	(GABRA4)	(GABRA5)	(NPY1R)	(NPY2R)
GRUPO 1 ENGEL 1	1	1,633704	6,178517	0,849152	2,0489	4,679222	1,713688	16,02033	9,086534
	2	2,346083	1,851637	0,779053	2,193509	4,960907	2,295167	6,738104	7,578549
	3	3,212335	5,528072	0,96846	1,853732	3,114418	0,586759	11,69497	2,121088
	4	27,428470	4,833799	2,829679	0,373222	1,702487	4,110048	37,52973	69,33055
	5	7,707103	6,058851	1,261214	1,809692	2,144364	5,229234	0,763211	0,610663
	6	5,461188	0,408161	1,099797	1,4057	2,09713	2,8662	1,77108	1,627317
	7	1,305198	0,382694	0,316529	0,473939	0,960488	0,306093	6,245091	8,30216
	8	2,522213	4,404478	0,828752	1,846745	6,652388	0,935888	9,838548	3,569577
	9	4,290823	1,847039	1,079838	0,518289	2,169657	0,688787	0,528804	0,328318
	10	2,325616	2,758184	0,890883	1,369811	2,67449	2,52559	1,06356	0,391535
GRUPO 2 ENGEL 3/4	1	1,67489	4,643045	0,867513	1,628994	3,380307	1,746265	3,604127	4,953334
	2	2,456951	1,455859	0,904501	2,057427	2,758726	1,302848	4,503051	3,124415
	3	1,425007	2,35258	0,621953	1,576248	3,860456	0,647293	11,97168	4,541426
	4	2,63277	5,194191	1,088645	2,243247	4,791669	1,355552	5,917515	8,034676
	5	1,653729	1,078845	0,764396	1,978165	3,820275	0,963974	8,322951	4,32048
	6	1,107801	1,077608	0,458435	0,650611	1,474175	0,553435	6,095279	5,064643
	7	2,076949	2,286678	0,952352	1,282506	1,294976	1,745485	3,087973	0,421943
	8	0,633471	1,701353	0,772779	1,695301	1,649099	0,955383	3,837968	2,819331
	9	0,925388	0,857032	0,895032	1,29478	0,19582	0,536915	0,397977	0,360462
	10	1,103737	2,741555	1,179489	1,679185	1,896454	0,507636	5,218924	1,740893
CONTROLE	1	1,596272	1,508957	1,391559	0,785205	1,384499	1,432548	0,938946	1,269686
	2	1,652443	0,300361	0,446305	0,970806	0,428497	0,227763	0,526012	0,302063
	3	1,089299	1,395844	2,80531	0,443544	0,327448	0,825647	0,168727	0,17446
	4	0,756862	0,098129	0,270585	0,60493	2,165378	2,832505	0,438713	2,338046
	5	0,507011	1,602002	1,55482	0,99428	0,694736	2,037791	0,466261	0,692896
	6	1,44332	1,326451	1,327219	0,676685	1,78742	0,899357	1,419062	0,919358
	7	0,770028	0,581335	0,492923	1,945687	1,198502	1,281194	3,197149	2,313246
	8	1,203298	1,849162	1,529838	1,62249	1,657724	0,460899	4,715289	5,833405
	9	1,000559	1,959132	0,869456	1,659122	0,71834	0,559577	2,833674	0,532408
	10	0,677799	3,59938	1,567787	1,387441	1,341391	2,164071	0,967717	1,39674

5. Discussão

5.1 O aumento das subunidades NMDA – NR2A e NR3A

O aumento da subunidade NR2C e a tendência da NR3A junto a subunidades de NMDAr nos coloca diante de reflexões em torno das características destes canais. Os canais contendo tanto NR2C quanto NR3A são canais menos permeáveis ao cálcio, NR2A=NR2B>**NR2C**=NR2D>**NR3A** ou NR3B (McIlhinney *et al.*, 2003; Paoletti e Neyton, 2007), o que seria esperado em um neurônio envolvido com a geração ou propagação de crises epiléticas, possuindo um fator de proteção celular à neurotoxicidade (Cendes *et al.*, 2014).

No estado epileptogênico e ictogênico instalado, com um desequilíbrio excitatório avançado (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008), o receptor contendo a subunidade NR2C compensaria sua hiperexcitabilidade com outras características, como um maior tempo de abertura de canal NR2D>>**NR2C**=NR2B>NR2A (Wang e Jensen, 1996; Cull-Candy *et al.*, 2001; Sanz-Clemente *et al.*, 2013; Glasgow *et al.*, 2015), menor pico de corrente NR2A>NR2B>**NR2C**=NR2D (Wang e Jensen, 1996; Glasgow *et al.*, 2015), menor sensibilidade ao zinco NR2A>NR2B>**NR2C**=NR2D (Glasgow *et al.*, 2015), e menor sensibilidade ao bloqueio de magnésio NR2A=NR2B>**NR2C**=NR2D (Wang e Jensen, 1996; Glasgow *et al.*, 2015), mantendo características epileptogênicas (Armijo *et al.*, 2000) e diminuindo a lesão celular causada pelo influxo de cálcio (Cendes *et al.*, 2014).

Este achado presente na ELTM em amígdala, em sua maior expressão no tecido de pacientes com maior controle pós-cirúrgico, como sugere este estudo, aliado ao achado em

modelo animal (Bo *et al.*, 2004), juntamente com os achados de esclerose tuberosa e displasia focal (Lozovaya *et al.*, 2014), se confirmado por novos estudos, pode caracterizar uma mudança estrutural da zona epileptogênica característica para além das mudanças em redes neuronais de pacientes com crises recorrentes. Desta forma se tornando um potencial alvo para uma terapêutica direcionada.

A tendência de aumento da subunidade NR3A deve ser confirmada com novos estudos e ampliação da população estudada.

Sabendo que subunidade NR3A possui diferentes possibilidades de arranjos com NR1/NR2/NR3 que caracterizam receptores com propriedades distintas de canais excitatórios (Glasgow *et al.*, 2015), a possibilidade de eferências sobre a estrutura torna-se limitada. Podendo este achado estimular a busca direcionada a possíveis transmissores formados por esta subunidade, sua caracterização e seus papeis junto a ELTM, ampliando o entendimento do papel desta subunidade e de seus receptores.

Posteriores estudos com análise por microscopia confocal de fluorescência usando a Transferência de Energia por Ressonância Foster (FRET) (Dailey *et al.*, 1999; Bocksteins *et al.*, 2009), poderiam caracterizar as outras subunidades que compõem este arranjo e auxiliar neste entendimento.

5.2 A ausência de tendência ou significância junto as subunidades KAr – GluK1 e GluK2

Apesar dos achados importantes relacionando os KAr e a amígdala (Braga *et al.*, 2004) e das possíveis implicações deste receptor na ELTM (Armijo *et al.*, 2000), o estudo não estabeleceu uma correlação direta com a expressão destes receptores.

Esta diferença entre os achados hipocámpais já estabelecidos (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2007; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008; Matute, 2011; Crepel e Mulle, 2015) e a evidência em amígdala apresentada por este estudo propõe mecanismos neuronais diferenciados nas duas estruturas envolvendo a subunidade GluK1, que se confirmado em novos estudos, poderão ampliar o entendimento de modificações estruturais da epileptogênese e ictogênese entre amígdala e hipocampo.

A grande variedade de montagens destas subunidades em KAr pode explicar esta variedade (Traynelis *et al.*, 2010), não excluindo a possibilidade da importância das subunidades GluK1 e GluK2 na ELTM.

A importância da montagem do KAr com GluK2/GluK5 (Matute, 2011; Peret *et al.*, 2014; Crepel e Mulle, 2015) pode ser encontrada de forma localizada em regiões chaves para o processo epileptogênico e ictogênico, como sub-núcleos específicos, não refletindo um aumento global da subunidade GluK2 em todo núcleo basolateral da amígdala.

O estudo de uma forma mais seletiva de núcleos amigdalianos poderia demonstrar variações mais localizada, exigindo, a utilização de técnicas moleculares associadas a microdissecção seletiva de núcleos, ou técnicas funcionais ou de imagem, como FRET, que possam demonstrar a composição das subunidades dos receptores, trazendo novas respostas.

5.3 O aumento da subunidade GABAA – $\alpha 4$ e não $\alpha 5$

Entender o aumento de subunidades junto a uma população neuronal que documentalmente está diminuída (Bernard *et al.*, 2000; Majores, M. *et al.*, 2007) é um ponto a ser considerado, ainda mais quando localizado em um tecido sugestivo da zona

epileptogênica, considerando sua maior expressão em tecido de pacientes com maior controle pós-cirúrgico, que necessita de mais estudos para inferências.

O aumento da subunidade $\alpha 4$, já evidenciado em hipocampo de modelos animais e pacientes, pode indicar alterações moleculares semelhantes entre hipocampo e amígdala, como: maior refratariedade de à medicação, devido a menor sensibilidade a benzodiazepínicos (Armijo *et al.*, 2005); alteração da expressão das subunidades com maior sensibilidade a zinco $\alpha 4$ (Blumcke *et al.*, 1999), o auxiliar na despolarização neuronal, assim como acontece em tecidos cerebrais em desenvolvimento (Bernard *et al.*, 2000).

O aumento da subunidade pode caracterizar mecanismo de proteção neuronal semelhante ao sugerido em achados em núcleo basolateral da amígdala em modelos animais (Fritsch *et al.*, 2009).

Ao contrário de outras regiões cerebrais e subunidades, não temos estabelecido os circuitos aos quais pertence a subunidade $\alpha 4$ na amígdala (Lee e Maguire, 2014), sendo necessário estudos para sistematizar este entendimento e avaliar seu papel na epilepsia.

A não diferenciação entre a subunidade $\alpha 5$ nos três grupos estudados corrobora com o achado de inalteração da expressão do gene GABRA5 na ELTM, podendo ser utilizado como gene endógeno-controle na ELTM, *house-keeping* (Wierschke *et al.*, 2010), servindo também de controle interno a este experimento e a escolha do TBP neste trabalho.

5.4 Os achados diferenciais entre Y2 e Y5.

Estudos demonstram em modelos animais (Woldbye *et al.*, 2005; Deborah Lin *et al.*, 2006; Woldbye *et al.*, 2010) um fator protetor Y2 e Y5, com aumento de Y2 em

hipocampo (Furtinger *et al.*, 2001; Avoli *et al.*, 2005; Meurs *et al.*, 2007; Clynen *et al.*, 2014) de pacientes de ELTM. O aumento da expressão de Y2 no núcleo basolateral da amígdala equivalente aos achados em hipocampo corrobora com a proposta de similaridade entre os achados de hipocampo e amígdala, e seus envolvimento em conjunto na epileptogênese e na ictogênese.

Analisando os resultados do pós-teste de Dunn junto a estes receptores e os outros achados de subunidades, foi evidenciado significância equivalente entre o controle e ambos os grupos de pacientes com epilepsia, ao contrário do ocorrido nas outras subunidades estudadas, não se estabelecendo a possibilidade de caracterizá-lo com a zona epileptogênica.

Mesmo não tendo evidenciado igual significância estatística junto ao sub tipo de NPYr Y5, é importante olhar ao potencial terapêutico que esta unidade possa ter, considerando a particularidade funcional causada pela heterodimerização Y1/Y5 (Gehlert *et al.*, 2007) que não pôde ser observada especificamente pela técnica utilizada.

5.5 Os achados diferenciais entre os grupos Engel 1 e Engel 3 e 4.

Entendendo que nos dois grupos temos pacientes previamente epiléticos há anos, refratários ao uso de medicação, com sintomas psiquiátricos e semiologia de crise equivalentes, podemos relacionar a diferença entre os dois grupos, Engel 1 e Engel 3 e 4, com a causa considerada mais comum de falha cirúrgica, a ressecção insuficiente da zona epileptogênica (Bertram, 2003; Noachtar e Borggraefe, 2009; Harroud *et al.*, 2012).

Mesmo considerando que o controle de crises nos pacientes ENGEL 1, não se deu apenas pela retirada do tecido amigdaliano, o aumento de expressão nas subunidades NMDA-

NR2C e, GABAA- α 4, com tendência ao aumento da expressão das subunidade NMDA-NR3A, apenas em relação aos pacientes com melhor controle de crise (Engel 1), refletem mudanças estruturais diferenciais, mesmo que relativas, entre as redes neuronais dos dois grupos de paciente que os relacionam com a participação da amígdala na zona epileptogênica, sendo elas exclusivas ou não desta estrutura, mas corroborando com papel da amígdala como foco iniciador e propagador das crises (Loscher e Ebert, 1996; Bertram e Scott, 2000) na ELTM em humanos (Bertram *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2007)..

Os achados de significância envolvendo apenas os pacientes com bom controle de crise, evidenciam uma possibilidade de marcador molecular da zona epileptogênica, podendo auxiliar tanto na busca farmacológica de alvos terapêuticos (Kemp e Mckernan, 2002; Kalia *et al.*, 2008; Cully, 2014; Zhu e Paoletti, 2015), a biomarcadores das regiões a serem ressecadas no procedimento cirúrgico (Engel Jr, 2008), possibilitando um avanço e novas possibilidades de entendimento das zona epileptogênica e demais zonas envolvidas na epilepsia (Luders *et al.*, 2006; Arzimanoglou e Kahane, 2008; Carreno e Lüders, 2008), se somando aos achados de exames já existentes para uma maior segurança terapêutica e uma seletividade maior das estruturas a serem ressecadas.

6. Conclusões

- a) Existe aumento significativo das subunidades GRIN2C do NMDAr no núcleo basolateral da amígdala de pacientes com ELTM com adequado controle de crise no pós-cirúrgico.
- b) Existe tendência ao aumento das subunidades GRIN3A do NMDAr no núcleo basolateral da amígdala de pacientes com ELTM com adequado controle de crise no pós-cirúrgico.
- c) Existe aumento significativo das subunidades $\alpha 4$ do GABA_Ar no núcleo basolateral da amígdala de pacientes com ELTM com adequado controle de crise no pós-cirúrgico.
- d) A não diferenciação entre o controle e os grupos de paciente com epilepsia na expressão da subunidade $\alpha 5$ do GABA_Ar, somada aos dados da literatura, sugere a possibilidade de uso de seu gene GABRA5 e do TBP como gene endógeno-controle nos estudos em ELTM.
- e) Existe aumento significativo do subtipo Y2 do NPYr no núcleo basolateral da amígdala de pacientes com ELTM, sem relação com o controle de crise no pós-cirúrgico.

- f) Não foi evidenciado diferença significativa das subunidades GLUK1 e GLUK2 dos KAR, e do subtipo Y5 do NPYr no núcleo basolateral da amígdala de pacientes com ELTM.
- g) O resultado desse estudo, comparado com a literatura, sugerem que os mecanismos neuronais envolvendo as subunidades GLUK1 e GLUK2 na epileptogênese e ictogênese podem ser diferentes na Amígdala e no Hipocampo.
- h) As diferenças significativas entre as subunidades $\alpha 4$ do GABAAR e GRIN2C do NMDAR, suas localizações diferenciadas no núcleo basolateral da amígdala de pacientes com ELTM com adequado controle de crise no pós-cirúrgico sugerem relação entre as alterações mencionadas destes receptores e a zona epileptogênica.
- i) Os resultados desse estudo, comparados com a literatura, sugerem que os mecanismos neuronais envolvendo as subunidades $\alpha 4$ do GABAAR e NMDAR GRIN2C, e subtipo Y2 do NPYr na epileptogênese e ictogênese podem ser semelhantes entre a Amígdala e o Hipocampo.

Referências

ADADA, B. Selective amygdalohippocampectomy via the transsylvian approach. **Neurosurg Focus**, v. 25, n. 3, p. E5, Sep 2008.

ADAMS, S. J. et al. Psychiatric history does not predict seizure outcome following temporal lobectomy for mesial temporal sclerosis. **Epilepsia**, v. 53, n. 10, p. 1700-1704, 2012.

AL SUFIANI, F.; ANG, L. C. Neuropathology of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res Treat**, v. 2012, p. 624519, 2012.

AMARAL, D. G.; SCHUMANN, C. M.; NORDAHL, C. W. Neuroanatomy of autism. **Trends in neurosciences**, v. 31, n. 3, p. 137-145, 2008.

ANDRADE-VALENÇA, L. P. et al. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 12, n. Suppl 1, p. 31-6, 2006.

ANDRADE-VALENÇA, L. P. A. et al. Mesial temporal lobe epilepsy: Clinical and neuropathologic findings of familial and sporadic forms. **Epilepsia**, v. 49, n. 6, p. 1046-1054, 2008.

ARMIJO, J. A.; DE LAS CUEVAS, I.; ADIN, J. Ion channels and epilepsy. **Revista De Neurologia**, v. 30, p. S25-S41, Jun 2000.

ARMIJO, J. A. et al. Ion channels and epilepsy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 15, p. 1975-2003, 2005.

ARONIADOU-ANDERJASKA, V. et al. Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 78, n. 2-3, p. 102-16, Feb 2008.

ARONIADOU-ANDERJASKA, V.; QASHU, F.; BRAGA, M. M. Mechanisms regulating GABAergic inhibitory transmission in the basolateral amygdala: implications for epilepsy and anxiety disorders. **Amino acids**, v. 32, n. 3, p. 305-315, 2007.

ARZIMANOGLU, A.; KAHANE, P. The ictal onset zone: general principles, pitfalls, and caveats. In: LUDERS, H. e BINGAMAN, W. (Ed.). **Textbook of epilepsy surgery**. London, UK: Informa Healthcare, 2008. cap. 67, p.597-602.

ATLASON, P. T. et al. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor. **J Biol Chem**, v. 282, n. 35, p. 25299-307, Aug 31 2007.

AVANZINI, G.; FRANCESCHETTI, S. Cellular biology of epileptogenesis. **The Lancet Neurology**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2003.

AVOLI, M.; DE CURTIS, M. GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. **Prog Neurobiol**, v. 95, n. 2, p. 104-32, Oct 2011.

AVOLI, M. et al. Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. **Prog Neurobiol**, v. 77, n. 3, p. 166-200, Oct 2005.

BABB, T. L. et al. Glutamate receptor mechanisms in human epileptic dysplastic cortex. **Epilepsy Research**, v. 32, p. 24-33, 1998.

BARABAN, S. C. Neuropeptide Y and epilepsy: recent progress, prospects and controversies. **Neuropeptides**, v. 38, n. 4, p. 261-265, Aug 2004.

BARD, L.; GROG, L. Glutamate receptor dynamics and protein interaction: Lessons from the NMDA receptor. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 48, n. 4, p. 298-307, Dec 2011.

BAUMGARTNER, C.; LEHNER-BAUMGARTNER, E. The functional deficit zone—general principles. In: LUDERS, H. e BINGAMAN, W. (Ed.). **Textbook of Epilepsy Surgery**. London, UK: Informa Healthcare, 2008. cap. 87, p.781-91.

BEGLEY, C. E.; DURGIN, T. L. The direct cost of epilepsy in the United States: A systematic review of estimates. **Epilepsia**, v. 56, n. 9, p. 1376-87, Sep 2015.

BELELLI, D. et al. Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. **J Neurosci**, v. 29, n. 41, p. 12757-63, Oct 14 2009.

BELL, G. S.; NELIGAN, A.; SANDER, J. W. An unknown quantity—The worldwide prevalence of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 7, p. 958-962, 2014.

BENARROCH, E. E. The amygdala Functional organization and involvement in neurologic disorders. **Neurology**, v. 84, n. 3, p. 313-324, 2015.

BERG, A. T.; SCHEFFER, I. E. New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1058-1062, 2011.

BERNARD, C. et al. What is GABAergic inhibition? How is it modified in epilepsy? **Epilepsia**, v. 41 Suppl 6, p. S90-5, 2000.

BERTRAM, E. H. Why does surgery fail to cure limbic epilepsy?: Seizure functional anatomy may hold the answer. **Epilepsy research**, v. 56, n. 2, p. 93-99, 2003.

BERTRAM, E. H. The relevance of kindling for human epilepsy. **Epilepsia**, v. 48, n. s.2, p. 65–74, 2007.

BERTRAM, E. H. Temporal lobe epilepsy: Where do the seizures really begin? **Epilepsy & Behavior**, v. 14, p. 32-37, Jan 2009.

BERTRAM, E. H.; SCOTT, C. The pathological substrate of limbic epilepsy: neuronal loss in the medial dorsal thalamic nucleus as the consistent change. **Epilepsia**, v. 41, n. s.6, p. s3-s8, 2000.

BERTRAM, E. H. et al. Functional anatomy of limbic epilepsy: a proposal for central synchronization of a diffusely hyperexcitable network. **Epilepsy Research**, v. 32, p. 194–205, 1998.

BINDER, D.; SCHRAMM, J. Resective surgical techniques: mesial temporal lobe epilepsy. In: LUDERS, H. e BINGAMAN, W. (Ed.). **Textbook of Epilepsy Surgery**. London, UK: Informa Healthcare, 2008. p.1083-1092.

BLUMCKE, I. et al. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 36, n. 2-3, p. 205-223, Sep 1999.

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

BO, T. et al. Long-term effects of seizures in neonatal rats on spatial learning ability and N-methyl-D-aspartate receptor expression in the brain. **Developmental brain research**, v. 152, n. 2, p. 137-142, 2004.

BOCKSTEINS, E. et al. Conserved Negative Charges in the N-terminal Tetramerization Domain Mediate Efficient Assembly of Kv2.1 and Kv2.1/Kv6.4 Channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 46, p. 31625-31634, Nov 13 2009.

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

BOTE, R. P. et al. Hippocampal sclerosis: histopathology substrate and magnetic resonance imaging. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 2008, Elsevier. p.2-14.

BRAGA, M. F.; ARONIADOU-ANDERJASKA, V.; LI, H. The physiological role of kainate receptors in the amygdala. **Molecular neurobiology**, v. 30, n. 2, p. 127-141, 2004.

BRAGIN, A.; WILSON, C. L.; ENGEL, J. Chronic epileptogenesis requires development of a network of pathologically interconnected neuron clusters: A hypothesis. **Epilepsia**, v. 41, p. S144-S152, 2000.

BROOKS-KAYAL, A. R. Rearranging receptors. **Epilepsia**, v. 46 Suppl 7, p. 29-38, 2005.

BUJARSKI, K. A. et al. Long-term seizure, cognitive, and psychiatric outcome following trans-middle temporal gyrus amygdalohippocampectomy and standard temporal lobectomy. **Journal of neurosurgery**, v. 119, n. 1, p. 16, 2013.

CACIAGLI, L. et al. Functional network alterations and their structural substrate in drug-resistant epilepsy. **Frontiers in neuroscience**, v. 8, 2014.

CAIRUS, H. F.; RIBEIRO JR, W. A. **Textos hipocráticos: o doente, o médico e a doença**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2005.

CARABALLO, R.; FEJERMAN, N. Management of epilepsy in resource-limited settings. **Epileptic Disord**, v. 17, n. 1, p. 13-8; quiz 18, Mar 2015.

CARRENO, M.; LÜDERS, H. General principles of presurgical. In: LÜDERS, H. (Ed.). **Textbook of epilepsy surgery**. London, UK: Informa Healthcare, 2008.

CARTA, M. et al. Kainate receptors in the hippocampus. **Eur J Neurosci**, v. 39, n. 11, p. 1835-44, Jun 2014.

CASCINO, G. D. Temporal lobe epilepsy: more than hippocampal pathology. **Epilepsy Currents**, v. 5, n. 5, p. 187, 2005.

CAVARA, N. A.; HOLLMANN, M. Shuffling the deck anew: how NR3 tweaks NMDA receptor function. **Molecular neurobiology**, v. 38, n. 1, p. 16-26, 2008.

CAVARA, N. A.; ORTH, A.; HOLLMANN, M. Effects of NR1 splicing on NR1/NR3B-type excitatory glycine receptors. **BMC Neurosci**, v. 10, p. 32, 2009.

CAVAZOS, J. E.; CROSS, D. J. The role of synaptic reorganization in mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 8, p. 483–493, 2006.

CENDES, F. et al. Temporal lobe epilepsy caused by domoic acid intoxication: evidence for glutamate receptor mediated excitotoxicity in humans. **Annals Neurology**, v. 37, p. 123–126, 1995.

CENDES, F. et al. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. **Acta neuropathologica**, v. 128, n. 1, p. 21-37, 2014.

CHOI, H. et al. Epilepsy surgery for pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy: a decision analysis. **JAMA**, v. 300, n. 21, p. 2497-505, Dec 3 2008.

CLANCY, M. J. et al. The prevalence of psychosis in epilepsy; a systematic review and meta-analysis. **BMC psychiatry**, v. 14, n. 1, p. 75, 2014.

CLUSMANN, H. Predictors, procedures, and perspective for temporal lobe epilepsy surgery. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 2008, Elsevier. p.60-70.

CLYNEN, E. et al. Neuropeptides as targets for the development of anticonvulsant drugs. **Molecular neurobiology**, v. 50, n. 2, p. 626-646, 2014.

COLMERS, W. F.; EL BAH, B. Neuropeptide Y and Epilepsy. **Epilepsy Curr**, v. 3, n. 2, p. 53-58, Mar 2003.

CONTRACTOR, A.; MULLE, C.; SWANSON, G. T. Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. **Trends Neurosci**, v. 34, n. 3, p. 154-63, Mar 2011.

CREPEL, V.; MULLE, C. Physiopathology of kainate receptors in epilepsy. **Curr Opin Pharmacol**, v. 20, p. 83-8, Feb 2015.

CULL-CANDY, S.; BRICKLEY, S.; FARRANT, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 3, p. 327-335, Jun 2001.

CULLY, M. Drug development: illuminated targets. **Nature**, v. 511, n. 7508, p. S12-S13, 2014.

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

D'ALESSIO, L. et al. Psychiatric outcome of epilepsy surgery in patients with psychosis and temporal lobe drug-resistant epilepsy: A prospective case series. **Epilepsy & Behavior**, v. 37, p. 165-170, 2014.

DA MOTA GOMES, M. História da epilepsia: um ponto de vista epistemológico. **J Epilepsy**, v. 12, n. 3, p. 161-167, 2006.

DAILEY, M. et al. Concepts in imaging and microscopy exploring biological structure and function with confocal microscopy. **Biological Bulletin**, v. 197, n. 2, p. 115-122, Oct 1999.

DE LANEROLLE, N. C. et al. A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. **Epilepsia**, v. 44, n. 5, p. 677-87, May 2003.

DE MOURA, J. C. et al. Amygdala gene expression of NMDA and GABAA receptors in patients with mesial temporal lobe epilepsy. **Hippocampus**, v. 22, n. 1, p. 92-97, Jan 2012.

DEBORAH LIN, E. J. et al. Differential actions of NPY on seizure modulation via Y1 and Y2 receptors: evidence from receptor knockout mice. **Epilepsia**, v. 47, n. 4, p. 773-780, 2006.

DEDEURWAERDERE, S. et al. In the grey zone between epilepsy and schizophrenia: alterations in group II metabotropic glutamate receptors. **Acta Neurologica Belgica**, p. 1-12, 2014.

DICHTER, M. A.; AYALA, G. F. Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. **Science**, v. 237, n. 4811, p. 157-64, Jul 10 1987.

DU, X. et al. Semiological and electroencephalographic features of epilepsy with amygdalar lesion. **Epilepsy research**, v. 111, p. 45-53, 2015.

DUPONT, S. et al. Lateralizing value of semiology in medial temporal lobe epilepsy. **Acta Neurologica Scandinavica**, 2015.

DUVARCI, S.; PARE, D. Amygdala microcircuits controlling learned fear. **Neuron**, v. 82, n. 5, p. 966-980, 2014.

ECCHER, M.; NAIR, D. The irritative zone: general principles. In: LÜDERS, H. e BINGAMAN, W. (Ed.). **Textbook of epilepsy surgery**. London, UK: Informa Healthcare London, 2008. cap. 55.

EICHENBAUM, H.; YONELINAS, A.; RANGANATH, C. The medial temporal lobe and recognition memory. **Annual review of neuroscience**, v. 30, p. 123, 2007.

ELSHARKAWY, A. E. et al. Apical temporal lobe resection; "tailored" hippocampus-sparing resection based on presurgical evaluation data. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 153, n. 2, p. 231-8, Feb 2011.

ENGEL, J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE task force on classification and terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 6, p. 796-803, 2001.

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

ENGEL, J. J.; VAN NESS, P. Outcome with respect to epileptic seizures. In: ENGEL, J. J. (Ed.). **Surgical Treatment of the Epilepsies**. New York: Raven, 1993. p. 609–621.

ENGEL JR, J. Future methods for the direct assessment of the epileptogenic zone. In: LÜDERS, H. e BINGAMAN, W. (Ed.). **Textbook of epilepsy surgery**. London, UK: Informa Healthcare London, 2008. cap. 99,

ENGELBORGH, S.; D'HOOGHE, R.; DE DEYN, P. P. Pathophysiology of epilepsy. **Acta Neurol Belg**, v. 100, n. 4, p. 201-13, Dec 2000.

EPSZTEIN, J. et al. Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. **J Neurosci**, v. 25, n. 36, p. 8229-39, Sep 7 2005.

EVA, C. et al. Role of brain neuroactive steroids in the functional interplay between the GABA(A) and the NPY-Y1 receptor mediated signals in the amygdala. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 84, n. 4, p. 568-80, Aug 2006.

FAN, X.; JIN, W. Y.; WANG, Y. T. The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, 2014.

FISHER, R. S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-482, 2014.

FRANK, R. A. Endogenous ion channel complexes: the NMDA receptor. **Biochem Soc Trans**, v. 39, n. 3, p. 707-18, Jun 2011.

FRITSCH, B. et al. Pathological alterations in GABAergic interneurons and reduced tonic inhibition in the basolateral amygdala during epileptogenesis. **Neuroscience**, v. 163, n. 1, p. 415-29, Sep 29 2009.

FUJIKAWA, D.; ITABASHI, H. Status epilepticus-induced brain damage in humans. **Epilepsia**, v. 35(s8), p. 9, 1994.

FURTINGER, S. et al. Plasticity of Y1 and Y2 receptors and neuropeptide Y fibers in patients with temporal lobe epilepsy. **J Neurosci**, v. 21, n. 15, p. 5804-12, Aug 1 2001.

GANZOLA, R.; MAZIADE, M.; DUCHESNE, S. Hippocampus and amygdala volumes in children and young adults at high-risk of schizophrenia: Research synthesis. **Schizophrenia research**, v. 156, n. 1, p. 76-86, 2014.

GARCIA-CAIRASCO, N. Puzzling challenges in contemporary neuroscience: insights from complexity and emergence in epileptogenic circuits. **Epilepsy Behav**, v. 14 Suppl 1, p. 54-63, Jan 2009.

GEHLERT, D. R. et al. Co-expression of neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors results in heterodimerization and altered functional properties. **Biochem Pharmacol**, v. 74, n. 11, p. 1652-64, Dec 3 2007.

GENOUX, D.; MONTGOMERY, J. M. Glutamate receptor plasticity at excitatory synapses in the brain. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 10, p. 1058-1063, Oct 2007.

GLASGOW, N. G.; SIEGLER RETCHLESS, B.; JOHNSON, J. W. Molecular bases of NMDA receptor subtype-dependent properties. **J Physiol**, v. 593, n. 1, p. 83-95, Jan 1 2015.

GOMES, M. M. Epilepsia e incapacidade laborativa. **J Epilepsy**, v. 15, n. 3, p. 130-134, 2009.

GONÇALVES, E. B.; CENDES, F. Depression in patients with refractory temporal lobe epilepsy. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 69, n. 5, p. 775-777, 2011.

GOTZSCHE, C. R. et al. Combined gene overexpression of neuropeptide Y and its receptor Y5 in the hippocampus suppresses seizures. **Neurobiol Dis**, v. 45, n. 1, p. 288-96, Jan 2012.

GRAVITZ, L. Sociology: Shedding the shame. **Nature**, v. 511, n. 7508, p. S10-S11, 2014.

GROSS, R. E.; MAHMOUDI, B.; RILEY, J. P. Less is more: novel less-invasive surgical techniques for mesial temporal lobe epilepsy that minimize cognitive impairment. **Current opinion in neurology**, v. 28, n. 2, p. 182-191, 2015.

GUILHOTOA, L. M. Revisão Terminológica e Conceitual para Organização de Crises e Epilepsias: Relato da Comissão da ILAE de Classificação e Terminologia, 2005-2009. Novos Paradigmas? **J Epilepsy**, v. 17, n. 3, p. 100-105, 2011.

HAMER, H.; KNAKE, S. The epileptogenic lesion: general principles. In: LUDERS, H. e BINGAMAN, W. (Ed.). **Textbook of epilepsy surgery**. Londo, UK: Informa Healthcare, 2008.

HARROUD, A. et al. Temporal lobe epilepsy surgery failures: a review. **Epilepsy research and treatment**, v. 2012, 2012.

HAUSER, W. Incidence and prevalence. In: ENGEL, J. e PEDLEY, T. (Ed.). **Epilepsy. A comprehensive textbook**. . Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. p.47-57.

HEIMER, L.; VAN HOESEN, G. W. The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 2, p. 126-147, 2006.

HOFFMANN, J. M.; ELGER, C. E.; KLEEFUSS-LIE, A. A. Lateralizing value of behavioral arrest in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 13, n. 4, p. 634-636, 2008.

HOWELL, E. Epilepsy stigma: Moving from a global problem to a global solution. **Seizure**, v. 19, n. 10, p. 628-629, 2010.

ISAACS, K. L. et al. Obsessive-compulsive symptoms in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 5, n. 4, p. 569-574, 2004.

ISOLAN, G. R. et al. Anatomia microcirúrgica do hipocampo na amígdalo-hipocampectomia seletiva sob a perspectiva da técnica de Niemeyer e método pré-operatório para maximizar a corticotomia. **Arq Neuro-psiquiatr**, v. 65, n. 4A, p. 1062-9, 2007.

JACOBY, A. et al. Public knowledge, private grief: a study of public attitudes to epilepsy in the United Kingdom and implications for stigma. **Epilepsia**, v. 45, n. 11, p. 1405-1415, 2004.

JACOBY, A.; SNAPE, D.; BAKER, G. A. Epilepsy and social identity: the stigma of a chronic neurological disorder. **The Lancet Neurology**, v. 4, n. 3, p. 171-178, 2005.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 284-292, 2015.

JIN, Z. et al. Expression of specific ionotropic glutamate and GABA-A receptor subunits is decreased in central amygdala of alcoholics. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 288, 2014.

JOBST, B. C.; CASCINO, G. D. Resective epilepsy surgery for drug-resistant focal epilepsy: A review. **JAMA**, v. 313, n. 3, p. 285-293, 2015.

JONES, J. E. et al. A controlled prospective investigation of psychiatric comorbidity in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 48, n. 12, p. 2357-2360, 2007.

KALIA, L. V.; KALIA, S. K.; SALTER, M. W. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 8, p. 742-55, Aug 2008.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Fisiopatologia dos transtornos de humor na epilepsia do lobo temporal. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 34, p. S233-S259, 2012.

KANNER, A. M. Depression and epilepsy: a review of multiple facets of their close relation. **Neurologic clinics**, v. 27, n. 4, p. 865-880, 2009.

KANNER, A. M.; MAZARATI, A.; KOEPP, M. Biomarkers of epileptogenesis: Psychiatric comorbidities (?). **Neurotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 358-372, 2014.

KAWAMURA, T. et al. Serious adverse effects of gamma knife radiosurgery for mesial temporal lobe epilepsy. **Neurologia medico-chirurgica**, v. 52, n. 12, p. 892-898, 2012.

KELLINGHAUS, C.; LÜDERS, H. The symptomatogenic zone: general principles. In: LÜDERS, H. (Ed.). **Textbook of epilepsy surgery**. London, UK: Informa Healthcare, 2008. p.425-31.

KEMP, J. A.; MCKERNAN, R. M. NMDA receptor pathways as drug targets. **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1039-42, Nov 2002.

KIKUCHI, S. et al. Alterations in N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA expression levels in cerebral cortex in kindling-induced epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 37, p. 113-114, Jul 1996.

KILPATRICK, C. et al. Preoperative evaluation for temporal lobe surgery. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 10, n. 5, p. 535-539, 2003.

KIMURA, Y. et al. Temporal lobe epilepsy with unilateral amygdala enlargement: morphometric MR analysis with clinical and pathological study. **J Neuroimaging**, v. 25, n. 2, p. 175-83, Mar-Apr 2015.

KLEIN, K.; ROSENOW, F. The epileptogenic zone: general principles. In: LUDERS, H. e BINGAMAN, W. (Ed.). **Textbook of epilepsy surgery**. London, UK: Informa Healthcare, 2008. cap. 98.

KWAN, P. et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, v. 51, n. 6, p. 1069-1077, 2010.

KWAN, P.; SPERLING, M. R. Refractory seizures: try additional antiepileptic drugs (after two have failed) or go directly to early surgery evaluation? **Epilepsia**, v. 50, n. s8, p. 57-62, 2009.

LA FOUGERE, C. et al. PET and SPECT in epilepsy: A critical review. **Epilepsy & Behavior**, v. 15, n. 1, p. 50-55, May 2009.

LANDAZURI, P. Mesial Temporal Lobe Epilepsy: A Distinct Electroclinical Subtype of Temporal Lobe Epilepsy. **The Neurodiagnostic Journal**, v. 54, n. 3, p. 274-288, 2014.

LARDIZABAL, D. Medical intractability in epilepsy. In: LUDERS, H. (Ed.). **Textbook of Epilepsy Surgery** London, UK, 2008. p.203-6.

LAXER, K. D. et al. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. **Epilepsy & Behavior**, v. 37, p. 59-70, 2014.

LEDO-VARELA, M. T.; GIMÉNEZ-AMAYA, J. M.; LLAMAS, A. El complejo amigdalino humano y su implicación en los trastornos psiquiátricos. **An. Sist. Sanit. Navar**, v. 30, n. 1, p. 61-74, 2007.

LEDRI, M. et al. Tuning afferent synapses of hippocampal interneurons by neuropeptide Y. **Hippocampus**, v. 21, n. 2, p. 198-211, Feb 2011.

LEE, V.; MAGUIRE, J. The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and celltype. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 8, n. 3, Feb 03 2014.

LEITE, J. P. et al. Plasticity, synaptic strength, and epilepsy: What can we learn from ultrastructural data? **Epilepsia**, v. 46, n. s. 5, p. 134-141, 2005.

LERMA, J. Kainate receptor physiology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 89-97, Feb 2006.

LERMA, J.; MARQUES, J. M. Kainate receptors in health and disease. **Neuron**, v. 80, n. 2, p. 292-311, Oct 16 2013.

LI, R. et al. Role of NMDA receptor subtypes in different forms of NMDA-dependent synaptic plasticity. **Bmc Neuroscience**, v. 8, Jul 26 2007.

LINDEN, R. Fisiologia. In: AIRES, M. D. M. (Ed.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan 1999. cap. 19, p.934.

LOESCH, A. M. et al. Seizure semiology identifies patients with bilateral temporal lobe epilepsy. **Epilepsy research**, v. 109, p. 197-202, 2015.

LOSCHER, W.; EBERT, U. The role of the piriform cortex in kindling. **Progress in Neurobiology**, v. 50, p. 427-481, 1996.

LOWENSTEIN, D. H. Pathways to discovery in epilepsy research: rethinking the quest for cures. **Epilepsia**, v. 49, n. 1, p. 1-7, 2008.

LOZOVAYA, N. et al. Selective suppression of excessive GluN2C expression rescues early epilepsy in a tuberous sclerosis murine model. **Nature communications**, v. 5, 2014.

LUDERS, H. O. et al. The epileptogenic zone: general principles. **Epileptic disorders**, v. 8, p. S1, 2006.

LUO, H. et al. Bilateral stereotactic radiofrequency amygdalohippocampectomy for a patient with bilateral temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 54, n. 11, p. e155-e158, 2013.

LUSCHER, B.; FUCHS, T.; KILPATRICK, C. L. GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. **Neuron**, v. 70, n. 3, p. 385-409, May 12 2011.

LV, R. J. et al. Temporal lobe epilepsy with amygdala enlargement: a subtype of temporal lobe epilepsy. **BMC Neurol**, v. 14, p. 194, 2014.

MACDONALD, R. L.; KANG, J. Q.; GALLAGHER, M. J. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. **J Physiol**, v. 588, n. Pt 11, p. 1861-9, Jun 1 2010.

MAGIORKINIS, E.; SIDIROPOULOU, K.; DIAMANTIS, A. Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. **Epilepsy & Behavior**, v. 17, n. 1, p. 103-108, 2010.

MAJORES, M. et al. Molecular neuropathology of temporal lobe epilepsy: complementary approaches in animal models and human disease tissue. **Epilepsia**, v. 48, n. s.2, p. 4-12, 2007.

MALIKOVA, H. et al. Different surgical approaches for mesial temporal epilepsy: resection extent, seizure, and neuropsychological outcomes. **Stereotactic and functional neurosurgery**, v. 92, n. 6, p. 372-380, 2014.

MALIKOVA, H. et al. Microsurgical and stereotactic radiofrequency amygdalohippocampectomy for the treatment of mesial temporal lobe epilepsy: different volume reduction, similar clinical seizure control. **Stereotactic and functional neurosurgery**, v. 88, n. 1, p. 42-50, 2010.

MALMGREN, K.; THOM, M. Hippocampal sclerosis—origins and imaging. **Epilepsia**, v. 53, n. s4, p. 19-33, 2012.

MALTHANKAR-PHATAK, G. H. et al. Differential glutamate dehydrogenase (GDH) activity profile in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 8, p. 1292–1299, 2006.

MANFORD, M. Assessment and investigation of possible epileptic seizures. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 70, n. suppl 2, p. ii3-ii8, 2001.

MANFROD, M. et al. National general practice study of epilepsy (NGPSE): partial seizure patterns in a general population. . **Neurology**, v. 42(10), p. 1911-7, 1992.

MARMIROLI, P.; CAVALETTI, G. The glutamatergic neurotransmission in the central nervous system. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 9, p. 1269-1276, 2012.

MATUTE, C. Therapeutic potential of kainate receptors. **CNS Neurosci Ther**, v. 17, n. 6, p. 661-9, Dec 2011.

MCILHINNEY, R. A. J. et al. Assembly of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 865-868, Aug 2003.

MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **J Neurosci**, v. 14, n. 6, p. 3413-25, Jun 1994.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 4, p. 1007S-1015S, 2000.

MEURS, A. et al. Clinical potential of neuropeptide Y receptor ligands in the treatment of epilepsy. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 17, p. 1660-1674, 2007.

MICHAEL, M. et al. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. **Pharmacol Rev**, v. 50, p. 143-150, 1998.

MILLER, L. A. et al. Amygdalar sclerosis: preoperative indicators and outcome after temporal lobectomy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 57:1099–1105, 1994. **Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry** v. 57, p. 1099–1105, 1994.

MINTZER, S.; SPERLING, M. R. When should a resection sparing mesial structures be considered for temporal lobe epilepsy? **Epilepsy & Behavior**, v. 13, n. 1, p. 7-11, 2008.

MIZIARA, C. S. M. G.; MIZIARA, I. D.; MUÑOZ, D. R. Epilepsia e trabalho: quando a epilepsia deve ser considerada incapacitante? **Saúde, Ética & Justiça**, v. 16, n. 2, 2011.

MOSES, S. N.; SUTHERLAND, R. J.; MCDONALD, R. J. Differential involvement of amygdala and hippocampus in responding to novel objects and contexts. **Brain Research Bulletin**, v. 58, n. 5, p. 517–527, 2002.

MOULT, P. R. Neuronal glutamate and GABAA receptor function in health and disease. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 6, p. 1317-22, Dec 2009.

MULLEY, J. C. et al. Channelopathies as a genetic cause of epilepsy. **Current opinion in neurology**, v. 16, n. 2, p. 171-176, 2003.

NAJM, I. M. et al. Epileptogenicity correlated with increased N-Methyl-D-Aspartate receptor subunit NR2A/B in human focal cortical dysplasia. **Epilepsia**, v. 41, n. 8, p. 971-976, 2000.

NIITTYKOSKI, M. et al. Electrophysiologic changes in the lateral and basal amygdaloid nuclei in temporal lobe epilepsy: An in vitro study in epileptic rats. **Neuroscience**, v. 124, n. 2, p. 269-281, 2004.

NOACHTAR, S.; BORGGRAEFE, I. Epilepsy surgery: a critical review. **Epilepsy & Behavior**, v. 15, n. 1, p. 66-72, 2009.

NOE, F. et al. Neuropeptide Y gene therapy decreases chronic spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Brain**, v. 131, n. Pt 6, p. 1506-15, Jun 2008.

NORONHA, A. L. et al. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. **Epilepsia**, v. 48, n. 5, p. 880-885, 2007.

OLSON, I. R.; PLOTZKER, A.; EZZYAT, Y. The Enigmatic temporal pole: a review of findings on social and emotional processing. **Brain**, v. 130, n. Pt 7, p. 1718-31, Jul 2007.

PAHL, S. et al. Trafficking of kainate receptors. **Membranes (Basel)**, v. 4, n. 3, p. 565-95, 2014.

PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 6, p. 383-400, Jun 2013.

PAOLETTI, P.; NEYTON, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 39-47, Feb 2007.

- PERET, A. et al. Contribution of aberrant GluK2-containing kainate receptors to chronic seizures in temporal lobe epilepsy. **Cell Rep**, v. 8, n. 2, p. 347-54, Jul 24 2014.
- PERRAIS, D.; VERAN, J.; MULLE, C. Gating and permeation of kainate receptors: differences unveiled. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, n. 11, p. 516-22, Nov 2010.
- PITKÄNEN, A.; ENGEL JR, J. Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. **Neurotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 231-241, 2014.
- PITKÄNEN, A. et al. Epileptogenesis in experimental models. **Epilepsia**, v. 48, n. s.2, p. 13-20, 2007.
- PITKANEN, A.; LUKASIUK, K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 14 Suppl 1, p. 16-25, Jan 2009.
- PITKANEN, A. et al. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 32, n. 1-2, p. 233-53, Sep 1998.
- QUINTANEIRO, T. D. O.; BARBOSA, M. L.; DE OLIVEIRA, M. G. **Um toque de clássicos: Durkheim, Marx e Weber**. Belo Horizonte, Brasil: Editora Ufmg, 2001.
- RAMEY, W. L. et al. Current management and surgical outcomes of medically intractable epilepsy. **Clinical neurology and neurosurgery**, v. 115, n. 12, p. 2411-2418, 2013.
- ŘEHULKA, P. et al. Ictal and postictal semiology in patients with bilateral temporal lobe epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 41, p. 40-46, 2014.
- REYNOLDS, E. H.; TRIMBLE, M. R. Epilepsy, psychiatry, and neurology. **Epilepsia**, v. 50, n. s3, p. 50-55, 2009.
- ROSENOW, F.; LUDERS, H. Presurgical evaluation of epilepsy. **Brain**, v. 124, p. 1683-1700, Sep 2001.
- SAJOBI, T. T.; FIEST, K. M.; WIEBE, S. Changes in quality of life after epilepsy surgery: the role of reprioritization response shift. **Epilepsia**, v. 55, n. 9, p. 1331-1338, 2014.
- SANTANA, M. T. C. G. et al. Auras and clinical features in temporal lobe epilepsy: a new approach on the basis of voxel-based morphometry. **Epilepsy research**, v. 89, n. 2, p. 327-338, 2010.
- SANZ-CLEMENTE, A.; NICOLL, R. A.; ROCHE, K. W. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. **Neuroscientist**, v. 19, n. 1, p. 62-75, Feb 2013.
- SARMENTO, M. R. S.; MINAYO-GOMEZ, C. A epilepsia, o epiléptico e o trabalho: relações conflitantes Epilepsy, epileptics, and work: conflicting relations. **Cad. Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 183-193, 2000.

SASAKI-ADAMS, D.; HADER, E. Temporal lobe epilepsy surgery: surgical complications. In: LUDERS, H. (Ed.). **Textbook of Epilepsy Surgery**. London, UK: Informa Healthcare, 2008. cap. 136, p.1288-1298.

SAVAGE, N. Epidemiology: The complexities of epilepsy. **Nature**, v. 511, n. 7508, p. S2-S3, 2014.

SAVASTANO, H. Aspectos sócio-culturais da epilepsia à luz da psicodinâmica: apresentação de uma entrevista com paciente epilética. **Revista de Saúde Pública**, v. 1, n. 2, p. 119-125, 1967.

SCHARFMAN, H. E.; GRAY, W. P. Relevance of seizure-induced neurogenesis in animal models of epilepsy to the etiology of temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 48, n. s.2, p. 33-41, 2007.

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

SCHRATTENHOLZ, A.; SOSKIC, V. NMDA receptors are not alone: dynamic regulation of NMDA receptor structure and function by neuregulins and transient cholesterol-rich membrane domains leads to disease-specific nuances of glutamate-signalling. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 6, n. 7, p. 663-686, 2006.

SCHULER, T. et al. Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. **J Biol Chem**, v. 283, n. 1, p. 37-46, Jan 4 2008.

SERDYUK, S. E.; GMIRO, V. E.; VESELKINA, O. S. Combined blockade of NMDA and AMPA receptors prevents acute kainate seizures and chronic kainate lethality in rats. **Bull Exp Biol Med**, v. 157, n. 1, p. 15-7, May 2014.

SHERWIN, A. L. Neuroactive amino acids in focally epileptic human brain: A review. **Neurochemical Research**, v. 24, n. 11, p. 1387-1395, 1999.

SHI, L. et al. Temporal sequence of ictal discharges propagation in the corticolimbic basal ganglia system during amygdala kindled seizures in freely moving rats. **Epilepsy Research**, v. 73(1), p. 85-97, 2007.

SHUMATE, M. D. et al. GABA(A) receptor function in epileptic human dentate granule cells: comparison to epileptic and control rat. **Epilepsy Res**, v. 32, n. 1-2, p. 114-28, Sep 1998.

SIEGHART, W. Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. **Adv Pharmacol**, v. 54, p. 231-63, 2006.

SIERRA-PAREDES, G.; SIERRA-MARCUNO, G. Extrasynaptic GABA and glutamate receptors in epilepsy. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 6, n. 4, p. 288-300, Aug 2007.

SILVA, A. V. D.; CABRAL, F. R. Ictogênese, epileptogênese e mecanismo de ação das drogas na profilaxia e tratamento da epilepsia. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 14, p. 39-45, 2008.

SIRVEN, J. I. Classifying seizures and epilepsy: a synopsis. **Semin Neurol**, v. 22, n. 3, p. 237-46, Sep 2002.

SNODGRASS, S. R. GABA and epilepsy: their complex relationship and the evolution of our understanding. **J Child Neurol**, v. 7, n. 1, p. 77-86, Jan 1992.

SOTO, D. et al. Glutamate receptor mutations in psychiatric and neurodevelopmental disorders. **Communicative & integrative biology**, v. 7, n. 1, p. e27887, 2014.

SPERK, G. et al. Expression of GABA(A) receptor subunits in the hippocampus of the rat after kainic acid-induced seizures. **Epilepsy Res**, v. 32, n. 1-2, p. 129-39, Sep 1998.

SQUIRE, L. R.; STARK, C. E.; CLARK, R. E. The medial temporal lobe*. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 27, p. 279-306, 2004.

SQUIRE, L. R.; STARK, C. E. L.; CLARK, R. E. The medial temporal lobe. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, p. 279-306, 2004.

STEPHENSON, F. Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. Pt 5, p. 877-881, 2006.

TELLEZ-ZENTENO, J. F.; HERNANDEZ-RONQUILLO, L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res Treat**, v. 2012, 2011.

TELLEZ-ZENTENO, J. F. et al. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. **Epilepsia**, v. 48, n. 12, p. 2336-44, Dec 2007.

TEOCCHI, M. A. et al. Hippocampal gene expression dysregulation of Klotho, nuclear factor kappa B and tumor necrosis factor in temporal lobe epilepsy patients. **J Neuroinflammation**, v. 10, p. 53, 2013.

TRACY, J. I.; DOUCET, G. E. Resting-state functional connectivity in epilepsy: growing relevance for clinical decision making. **Current opinion in neurology**, v. 28, n. 2, p. 158-165, 2015.

TRAVERS, R. F. Limbic epilepsy. **J R Soc Med**, v. 84, n. 8, p. 454-6, Aug 1991.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacol Rev**, v. 62, n. 3, p. 405-96, Sep 2010.

URE, J. A.; PERASSOLO, M. Update on the pathophysiology of the epilepsies. **Journal of the neurological sciences**, v. 177, n. 1, p. 1-17, 2000.

VALE, F. L. et al. Long-term radiosurgery effects in the treatment of temporal lobe epilepsy: Case report. **Journal of neurosurgery**, v. 117, n. 5, p. 962-969, 2012.

VALENTE, K. D.; BUSATTO FILHO, G. Depression and temporal lobe epilepsy represent an epiphenomenon sharing similar neural networks: clinical and brain structural evidences. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 71, n. 3, p. 183-190, 2013.

VELÍSEK, L.; MOSHÉ, S. L. Temporal lobe epileptogenesis and epilepsy in developing brain: bridging the gap in the laboratory and the clinic. Progression, but in what direction? **Epilepsia**, v. 44, n. s.12, p. 51-59, 2003.

VOLCY-GÓMEZ, M. Epilepsia del lóbulo temporal mesial: fisiopatología, características clínicas, tratamiento y pronóstico. **REVISTA DE NEUROLOGÍA**, v. 38, n. 7, p. 663-667, 2004.

WANG, C.; JENSEN, F. E. Age dependence of NMDA receptor involvement in epileptiform activity in rat hippocampal slices. **Epilepsy Research**, v. 23, n. 2, p. 105-113, Mar 1996.

WENDLING, A.-S. et al. Selective amygdalohippocampectomy versus standard temporal lobectomy in patients with mesiotemporal lobe epilepsy and unilateral hippocampal sclerosis: post-operative facial emotion recognition abilities. **Epilepsy research**, v. 111, p. 26-32, 2015.

WEST, P. J.; DALPE-CHARRON, A.; WILCOX, K. S. Differential contribution of kainate receptors to excitatory postsynaptic currents in superficial layer neurons of the rat medial entorhinal cortex. **Neuroscience**, v. 146, n. 3, p. 1000-1012, May 25 2007.

WHEATLEY, B. M. Selective amygdalohippocampectomy: the trans-middle temporal gyrus approach. **Neurosurg Focus**, v. 25, n. 3, p. E4, Sep 2008.

WIEBE, S. Epidemiology of temporal lobe epilepsy. **Can J Neurol Sci**, v. 27 Suppl 1, p. S6-10; discussion S20-1, May 2000.

WIEBE, S. Perspective: The surgical solution. **Nature**, v. 511, n. 7508, p. S7-S7, 2014.

WIERSCHKE, S. et al. Evaluating reference genes to normalize gene expression in human epileptogenic brain tissues. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 403, n. 3-4, p. 385-90, Dec 17 2010.

WIESER, H. G. Mesial temporal lobe epilepsy versus amygdalar epilepsy: late seizure recurrence after initially successful amygdalotomy and regained seizure control following hippocampectomy. **Epileptic Disorders**, v. 2, n. 3, p. 141-151, Sep 2000.

WILMSHURST, J. M.; BIRBECK, G. L.; NEWTON, C. R. Epilepsy is ubiquitous, but more devastating in the poorer regions of the world... or is it? **Epilepsia**, v. 55, n. 9, p. 1322-1325, 2014.

WOLDBYE, D. P. et al. Adeno-associated viral vector-induced overexpression of neuropeptide Y Y2 receptors in the hippocampus suppresses seizures. **Brain**, v. 133, n. 9, p. 2778-88, Sep 2010.

WOLDBYE, D. P. et al. Differential suppression of seizures via Y2 and Y5 neuropeptide Y receptors. **Neurobiology of disease**, v. 20, n. 3, p. 760-772, 2005.

WOLF, P. History of epilepsy: nosological concepts and classification. **Epileptic Disorders**, v. 16, n. 3, p. 261-269, 2014.

YAARI, Y.; BECK, H. "Epileptic neurons" in temporal lobe epilepsy. **Brain Pathol**, v. 12, n. 2, p. 234-9, Apr 2002.

YANG, W. et al. A three amino acid tail following the TM4 region of the N-methyl-D-aspartate receptor (NR) 2 subunits is sufficient to overcome endoplasmic reticulum retention of NR1-1a subunit. **J Biol Chem**, v. 282, n. 12, p. 9269-78, Mar 23 2007.

YING, Z. et al. Selective coexpression of NMDAR2A/B and NMDAR1 subunit proteins in dysplastic neurons of human epileptic cortex. **Experimental Neurology**, v. 159, n. 2, p. 409-418, Oct 1999.

YUAN, H. et al. Ionotropic GABA and Glutamate Receptor Mutations and Human Neurological Diseases. **Mol Pharmacol**, Apr 22 2015.

ZHU, S.; PAOLETTI, P. Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms. **Curr Opin Pharmacol**, v. 20, p. 14-23, Feb 2015.

Anexos

Anexo 1 – Aprovação CEP-HCFMRP-USP Banco de Amostras

CEP 14048-000
RIBEIRÃO PRETO - SP,
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO – MONTE ALEGRE
FONE: 032-1000 - FAX (016) 639-1144

Ribeirão Preto, 12 de abril de 2000

Ofício nº 856/2000
CEP/CDGC

Senhor Professor:

O trabalho intitulado **"FORMAÇÃO DE UM BANCO DE AMOSTRAS DE TUMOR DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 80ª Reunião Ordinária realizada em 21/02/2000, e enquadrado na categoria: **APROVADO, com recomendação do parecer em anexo**, de acordo com o Processo HCRP nº 7645/99.

No aguardo das providências solicitadas, aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROFA.DRA. CLARISSE DULCE G. CARVALHEIRO
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. CARLOS GILBERTO CARLOTTI JUNIOR
Depto. de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia
Em mãos