

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento

**ESTUDO DO PADRÃO DE GLIOSE E DA EXPRESSÃO DAS  
METALOTIONEINAS I/II, DA AQUAPORINA-4 E DE  
COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR NO HIPOCAMPO  
DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL**

José Eduardo Peixoto Santos

Ribeirão Preto  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

José Eduardo Peixoto Santos

**ESTUDO DO PADRÃO DE GLIOSE E DA EXPRESSÃO DAS  
METALOTIONEINAS I/II, DA AQUAPORINA-4 E DE  
COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR NO HIPOCAMPO  
DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Neurociências e  
Ciências do Comportamento da  
Faculdade de Medicina de Ribeirão  
Preto para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração: Neurologia  
Opção: Neurociências

Ribeirão Preto  
2010

Ficha de Aprovação

**ESTUDO DO PADRÃO DE GLIOSE E DA EXPRESSÃO DAS METALOTIONEINAS I/II, DA AQUAPORINA-4 E DE COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR NO HIPOCAMPO DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL**

Dissertação apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração: Neurologia

Opção: Neurociências

COMISSÃO JULGADORA

---

Presidente e Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

---

Examinador: Prof. Dr. José Eymard Homem Pittella

---

Examinador: Prof. Dr. Jaime Eduardo Cecílio Hallak

Aprovado em \_\_\_\_\_

いくら目ん玉ひん剥いても 見えねえもんは見えねえんだけどなあ。

*"Por mais que eu abra meus olhos, eu não enxergo aquilo que não posso ver."*

Takeshi Kitano, em *Zatōichi* (2003)

Dedico este trabalho a todos aqueles que dedicam suas vidas ao desenvolvimento do conhecimento humano.

Em especial, dedico este trabalho à minha avó Odete, que infelizmente não pode estar presente para acompanhar o desfecho desta etapa de meus estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que sempre me ajudou de todas as formas possíveis.

Ao professor João Pereira Leite, pela orientação e auxílio, sempre necessários, e paciência com todos os erros e falhas no decorrer deste projeto. Aos professores Orfa Yineth, Cássio dos Reis e David Araújo, pela ajuda nas diversas etapas do desenvolvimento deste projeto.

À técnica Renata C. Scanduzzi, pela ajuda com a parte técnica dos experimentos.

Ao apoio financeiro da FAPESP, crucial para o desenvolvimento deste projeto.

Aos docentes e funcionários da FMRP-USP e do HCRP-USP, por sua atuação direta e indireta em minha formação profissional e pessoal e no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de dentro e fora do laboratório, sempre me apoiado, ouvindo e dando dicas importantes para o meu projeto. E também pelas conversas mais variadas.

## RESUMO

**Introdução:** A epilepsia do lobo temporal (ELT) é caracterizada por apresentar grande porcentagem de resistência ao tratamento farmacológico, perda neuronal progressiva, gliose e reorganização anormal de axônios que contêm zinco (Zn) vesicular, em estruturas límbicas como o hipocampo. As metalotioneínas I/II (MT-I/II) são proteínas envolvidas na modulação da concentração do Zn livre, metal que em concentrações na faixa de micromoles, induz morte celular em sistemas “*in vitro*”. Alguns estudos sugerem que as MT-I/II fazem parte de mecanismos endógenos de neuroproteção. Dados preliminares em nosso laboratório sugeriram que o volume hipocampal, avaliado pela ressonância magnética (RNM), pode não estar diretamente relacionado à intensidade de perda neuronal, constatada histologicamente. Alterações na densidade de outras populações celulares encontradas no tecido, bem como de proteínas ligadas à homeostase da água, como a aquaporina-4 e proteínas da matriz extracelular, podem ser fatores importantes para melhor definir a associação entre características do tecido e volumetria na RNM. **Objetivos:** Avaliar no hipocampo de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico de ELT resistente ao tratamento farmacológico com diferentes intensidades de redução do volume hipocampal: populações neuronal e glial ativada; expressão das metalotioneínas I/II e da aquaporina-4 e suas co-localizações com astrócitos; expressão de condroitin sulfato (CSPG) e ácido hialurônico (AH); 5) correlacionar todos os achados com características morfométricas hipocampais medidas na RNM. **Metodologia:** Foram avaliadas formações hipocampais de casos de autópsia sem alterações neurológicas (Ctrl, n=20), pacientes com ELT fármaco-resistente com diagnóstico de ELTM (n=69) e pacientes com ELT associada a tumor ou displasia cortical (TD, n=20). Os pacientes do grupo ELTM foram posteriormente subdivididos em grupos com volume hipocampal normal (VN, n=24), atrofia leve (AL, n=24) e atrofia grave (AG, n=21), de acordo com volumetria medida na RNM. Secções hipocampais de todos os grupos foram processadas por imunohistoquímicas de NeuN, GFAP, HLA-DR, MT-I/II, AQP4 e CS-56 e para a histoquímica de HABP e foram avaliadas as densidades neuronais, áreas imunopositivas para NeuN, GFAP, HLA-DR, MT-I/II, AQP4 e CS-56 e nível de cinza de HABP. **Resultados:** Observou-se, em comparação ao grupo Ctrl: perda neuronal em todas as regiões, exceto pelo subículo, em casos do grupo ELTM e em CA3 do grupo TD; redução da área de NeuN em várias regiões dos grupos ELTM; astrogliose em todas as regiões hipocampais do grupo ELTM e na *fascia dentata*, hilo e região CA4 do grupo TD; microgliose em praticamente todas as regiões do grupo ELTM e apenas no hilo do grupo TD; aumento da área de MT-I/II em várias regiões dos grupos ELTM, principalmente no subgrupo AG, e nas camadas moleculares e subgranular do grupo TD; redução na área de AQP4 em algumas regiões dos grupos ELTM e em CA4 do grupo TD; aumento da área

de CS em algumas regiões do grupo ELTM, notadamente no subgrupo VN; inalteração no nível de HABP, exceto por redução na camada subgranular do grupo AG. A volumetria hipocampal correlacionou-se, no grupo ELTM, com a população neuronal e as áreas de CS-56 e GFAP em CA1, levando à construção de modelos de regressão linear múltipla onde a população neuronal e a área de CS-56 explicam quase 40% do volume hipocampal. **Conclusões:** Independente do volume hipocampal, os grupos ELTM apresentaram homogeneidade nas alterações das populações celulares, bem como nas demais moléculas avaliadas. Ainda, mesmo regiões aparentemente protegidas da morte neuronal apresentam alterações morfológicas na população neuronal, bem como alterações em outras características teciduais avaliadas. Quanto às MT-I/II, houve correlações com a proteção neuronal no grupo com preservação da densidade neuronal (TD) e estas proteínas mostraram-se boas marcadoras de alterações em casos com perda neuronal grave (ELTM). Nos pacientes ELTM tanto a população neuronal como a expressão de CS possuem peso sobre a volumetria hipocampal medida na RNM.

## ABSTRACT

**Introduction:** The main features of temporal lobe epilepsy (TLE) are drug resistance, progressive neuronal dropout, gliosis and sprouting of zinc-enriched axons on the hippocampus. Metallothioneins I/II (MT-I/II) are proteins associated to control of free zinc, metal that, on micromole range, can lead to cell death *in vitro* system. Some works suggest that MT-I/II are part of endogenous neuroprotection mechanisms. Preliminary data from our lab indicated that the hippocampal volumetry, measured on magnetic resonance imaging (MRI), may not be directly linked to the reduction on neuronal density. Alterations on other cellular populations and of proteins related to water homeostasis, such as aquaporin-4 and proteins from the extracellular matrix (ECM), can be important to delineate a better correlation between tissue characteristics and the volumetry on MRI. **Objectives:** To evaluate, on hippocampus from patients with drug-resistant TLE and with or without MRI volumetry: neuronal and glial active populations; expression of MT-I/II and AQP4 and its colocalization with GFAP; expression of chondroitin sulfate (CSPG) and hyaluronic acid (HA); correlate all markers evaluated with hippocampal morfometry on MRI. **Methods:** Hippocampal formations from autopsies of patients without neurological alterations (Ctrl, n=20), patients with drug-resistant TLE with diagnosis of MTLE and different volumetric profiles on MRI (normal volume, n=24; mild atrophy, n=24; and severe atrophy, n=21) and patients with TLE associated with tumor or cortical dysplasia (TD, n=20) were evaluated with NeuN, GFAP, HLA-DR, MT-I/II, AQP4 and CS-56 immunohistochemistry and HABP histochemistry. **Results:** Compared to Ctrl: all hippocampal subfields but subiculum

showed neuronal dropout on MTLE cases and CA3 on TD; several subfields of MTLE group showed decrease on NeuN stained area; astrogliosis on all hippocampal subfields of MTLE and in *fascia dentata*, hilus and CA4 of TD; microgliosis on almost all hippocampal subfields on MTLE and on hilus of TD; increased MT-I/II area on several subfields of MTLE, specially on severe hippocampal atrophy, and on molecular and subgranular layers of TD; decreased AQP4 area on some subfields of MTLE and in CA4 of TD group; increased CS area on some subfields, specially on normal volume cases; maintenance of HA levels, except for decreased gray level in subgranular layer of severe atrophy. Hippocampal volumetry correlated, on MTLE group, with neuronal population and CS-56 and GFAP areas in CA1, leading to the development of multiple linear regressions where neuronal population and CS expression in CA1 explained almost 40% of the hippocampal volume on MRI. **Conclusions:** Regardless of the hippocampal volume, MTLE groups showed the same degree of changes on all evaluated parameters (cells and molecules). Even subfields without apparent reduction on neuronal density showed morphological alterations on neurons and on other studied variables. MT-I/II revealed two main associations: when neuronal population were preserved (TD group), MT correlated positively with neuronal density; in cases of severe neuronal dropout (MTLE groups) this proteins could be considered good markers of alteration. On MTLE, the neuronal population and CS molecules presented important correlation with MRI volumetry.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	V
AGRADECIMENTOS .....	VI
RESUMO .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE TABELAS .....	XIII
LISTA DE ABREVIACÕES .....	XIV
1. MARCO TEÓRICO.....	1
2. OBJETIVOS .....	11
3. METODOLOGIA.....	12
3.1. Pacientes e procedimento clínico-patológico de ELT.....	12
3.2. Aspectos éticos/consentimento do paciente .....	12
3.3. Grupos de pacientes .....	13
3.4. Coleta e processamento do tecido .....	14
3.5. Histologia.....	15
3.5.1. <i>Imunohistoquímica / Histoquímica</i> .....	15
3.5.2. <i>Análise da intensidade da marcação das imunohistoquímicas</i> .....	17
3.5.3. <i>Contagem neuronal</i> .....	19
3.6. Volumetria hipocampal.....	19
3.7. Análise estatística.....	20
4. RESULTADOS .....	22
4.1. Dados Clínicos.....	22
4.2. Volume e área hipocampal .....	25
4.3. População Neuronal .....	28
4.4. Astrocitose .....	39
4.5. Microgliose .....	48
4.6. Metalotioneínas I e II .....	57
4.7. Aquaporina 4 .....	67
4.8. Condroitin Sulfato .....	77
4.9. Ácido Hialurônico.....	87
4.10. Correlações.....	95
4.10.1. <i>Morfometria, populações celulares e demais proteínas avaliadas</i> .....	95
4.10.2. <i>Populações celulares</i> .....	98
4.10.3. <i>Metalotioneínas I/II e populações celulares</i> .....	100
4.10.4. <i>Aquaporina 4 e populações celulares.</i> .....	101
4.10.5. <i>Condroitin sulfato e populações celulares</i> .....	103
4.10.6. <i>Ácido hialurônico e populações celulares</i> .....	105
4.11. Regressões .....	109
5. DISCUSSÃO .....	113
5.1. Alterações Neuronais.....	114
5.2. População Glial .....	118
5.3. Metalotioneínas I/II .....	123
5.4. Aquaporina 4 .....	128
5.5. Moléculas de matriz extracelular .....	129
5.6. Características teciduais e volume hipocampal .....	136
6. CONCLUSÃO.....	137
7. REFERÊNCIAS .....	138

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Regiões hipocâmpais.....	17
<b>Figura 2.</b> Imagens representativas das imunohistoquímicas com e sem o uso da função de limiar .....	18
<b>Figura 3.</b> Volumetria total e apenas do corpo dos hipocâmpos ipsilateral e contralateral dos grupos VN, AL e AG....	25
<b>Figura 4.</b> Área coronal total e apenas do corpo dos hipocâmpos ipsilateral e contralateral dos grupos VN, AL e AG ..	26
<b>Figura 5.</b> Imagens representativas da imunohistoquímica para NeuN.....	30
<b>Figura 6.</b> Densidades neuronais e porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-NeuN.....	31
<b>Figura 7.</b> Densidades neuronais e porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-NeuN.....	32
<b>Figura 8.</b> Densidades neuronais e porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-NeuN.....	33
<b>Figura 9.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com anticorpo anti-NeuN.....	34
<b>Figura 10.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal com anticorpo anti-NeuN.....	35
<b>Figura 11.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com anticorpo anti-NeuN.....	36
<b>Figura 12.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com anticorpo anti-NeuN.....	37
<b>Figura 13.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo tumor/dislplasia marcadas com anticorpo anti-NeuN.....	38
<b>Figura 14.</b> Imagens representativas da imunohistoquímica para GFAP.....	40
<b>Figura 15.</b> Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-GFAP.....	41
<b>Figura 16.</b> Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-GFAP.....	42
<b>Figura 17.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com anticorpo anti-GFAP.....	43
<b>Figura 18.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com anticorpo anti-GFAP.....	44
<b>Figura 19.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com anticorpo anti-GFAP.....	45
<b>Figura 20.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com anticorpo anti-GFAP.....	46
<b>Figura 21.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo tumor/dislplasia marcadas com anticorpo anti-GFAP.....	47
<b>Figura 22.</b> Imagens representativas da imunohistoquímica para HLA-DR.....	49
<b>Figura 23.</b> Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-HLA-DR.....	50
<b>Figura 24.</b> Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-HLA-DR.....	51
<b>Figura 25.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com anticorpo anti-HLA-DR.....	52
<b>Figura 26.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com anticorpo anti-HLA-DR.....	53
<b>Figura 27.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com anticorpo anti-HLA-DR.....	54
<b>Figura 28.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com anticorpo anti-HLA-DR.....	55
<b>Figura 29.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo tumor/dislplasia marcadas com anticorpo anti-HLA-DR.....	56
<b>Figura 30.</b> Imagens representativas da imunohistoquímica para MT-I/II.....	58
<b>Figura 31.</b> Colocalização de MT-I/II com GFAP.....	59
<b>Figura 32.</b> Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-MT-I/II.....	60
<b>Figura 33.</b> Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-MT-I/II.....	61
<b>Figura 34.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com anticorpo anti-MT-I/II.....	62
<b>Figura 35.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com anticorpo anti-MT-I/II.....	63
<b>Figura 36.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com anticorpo anti-MT-I/II.....	64
<b>Figura 37.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com anticorpo anti-MT-I/II.....	65
<b>Figura 38.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo tumor/dislplasia marcadas com anticorpo anti-MT-I/II.....	66
<b>Figura 39.</b> Imagens representativas da imunohistoquímica para AQP4.....	68
<b>Figura 40.</b> Colocalização de AQP4 com GFAP.....	69
<b>Figura 41.</b> Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-AQP4.....	70
<b>Figura 42.</b> Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-AQP4.....	71
<b>Figura 43.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com anticorpo anti-AQP4.....	72
<b>Figura 44.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com anticorpo anti-AQP4.....	73
<b>Figura 45.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com anticorpo anti-AQP4.....	74
<b>Figura 46.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com anticorpo anti-AQP4.....	75
<b>Figura 47.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo tumor/dislplasia marcadas com anticorpo anti-AQP4.....	76
<b>Figura 48.</b> Imagens representativas da imunohistoquímica para CSPG.....	79
<b>Figura 49.</b> Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-CS-56.....	80
<b>Figura 50.</b> Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-CS-56.....	81
<b>Figura 51.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com anticorpo anti-CS-56.....	82
<b>Figura 52.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com anticorpo anti-CS-56.....	83
<b>Figura 53.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com anticorpo anti-CS-56.....	84
<b>Figura 54.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com anticorpo anti-CS-56.....	85
<b>Figura 55.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo tumor/dislplasia marcadas com anticorpo anti-CS-56.....	86
<b>Figura 56.</b> Imagens representativas da histoquímica com HABP.....	87
<b>Figura 57.</b> Nível de cinza da marcação da proteína HABP.....	88
<b>Figura 58.</b> Nível de cinza da marcação da proteína HABP.....	89
<b>Figura 59.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com a proteína HABP.....	90
<b>Figura 60.</b> Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com a proteína HABP.....	91

<b>Figura 61.</b> Secções hipocampais de casos do grupo atrofia leve marcadas com a proteína HAPB.....	92
<b>Figura 62.</b> Secções hipocampais de casos do grupo atrofia grave marcadas com a proteína HAPB .....	93
<b>Figura 63.</b> Secções hipocampais de casos do grupo tumor/displasia marcadas com a proteína HAPB .....	94
<b>Figura 64.</b> Regressão linear entre densidade neuronal em CA1 e volume hipocampal.....	111
<b>Figura 65.</b> Regressão linear entre as áreas de CS-56 e GFAP em CA1 e o volume hipocampal .....	112

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados da necrópsia do grupo controle.....	21
<b>Tabela 2.</b> Laudos das biópsias cirúrgicas, emitidos pelo SERPAT .....	22
<b>Tabela 3.</b> Resumo das alterações observadas em relação ao grupo Ctrl. ....	113

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

A <sub>CS-56</sub>	Área imunopositiva para CS-56
ADC	Coefficiente de difusão aparente
AG	Atrofia hipocampal grave
A <sub>GFAP</sub>	Área imunopositiva para GFAP
AH	Ácido hialurônico
AL	Atrofia hipocampal leve
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico
A <sub>NeuN</sub>	Área imunopositiva para NeuN
AQP	Aquaporina
AQP4	Isoforma 4 de aquaporina
ATP	Adenosina trifosfato
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
CA1	Região 1 do Corno de Amon
CA2	Região 2 do Corno de Amon
CA3	Região 3 do Corno de Amon
CA4	Região 4 do Corno de Amon
CIREP	Centro de cirurgia de epilepsia da USP de Ribeirão Preto
CS	Condroitin sulfato
CSPG	Proteoglicano de condroitin sulfato
Ctrl	Controle
DAB	3,3'-diaminobenzidina tetrahydrocloroeto
d <sub>neuronal</sub>	Densidade neuronal
EEC	Espaço extracelular
EEG	Eletro-encefalograma
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELT	Epilepsia do lobo temporal
ELTM	Epilepsia do lobo temporal mesial
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor tipo A do ácido $\gamma$ -aminobutírico
GalNAc	N-acetil-galactosamina
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GluA	Ácido glicurônico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
H <sub>contra</sub>	Hipocampo contralateral ao hemisfério de origem das crises
H <sub>ipsi</sub>	Hipocampo ipsilateral ao hemisfério de origem das crises
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano tipo DR
IL	Interleucina
IPI	Injúria precipitante inicial
K <sup>+</sup>	Potássio
MBV	Morfometria baseada em voxel
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MT	Metalotioneína
MT-I/II	Isotipos I e II de metalotioneína

MT-III	Isotipo III de metalotioneína
NeuN	Antígeno neuronal nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBS	Tampão fosfato-salina
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PTZ	Pentilenotetrazol
RNM	Ressonância nuclear magnética
RPTP	Receptor de proteína tirosina fosfatase
SNC	Sistema nervoso central
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
TD	Tumor / Displasia
TGF	Fator de crescimento transformante
TMA	Tetrametilamônio
TNF	Fator de necrose tumoral
VN	Volume hipocampal normal
Vt	Volume hipocampal total
Zn	Zinco
a	Indica diferença entre o grupo assinalado e o controle
b	Indica diferença entre o grupo assinalado e o grupo volume normal
c	Indica diferença entre o grupo assinalado e o grupo atrofia leve
d	Indica diferença entre o grupo assinalado e o grupo atrofia grave
e	Indica diferença entre o grupo assinalado e o grupo tumor/dislplasia
↑	Aumento em relação aos níveis do controle
↓	Redução em relação aos níveis do controle
∅	Sem alteração em comparação com o controle
—	Medida não realizada / dado inexistente

## 1. MARCO TEÓRICO

### **Epilepsia do Lobo Temporal**

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais freqüente de epilepsia focal em adultos e tem sido considerada um problema social e médico importante devido a sua resistência ao tratamento farmacológico com drogas antiepiléticas de primeira linha (Gastaut *et al.*, 1975). Os pacientes com ELT mesial (ELTM) geralmente apresentam, na sua história clínica, um antecedente de uma injúria precipitante inicial (IPI) e melhor prognóstico pós-cirúrgico do que pacientes sem esclerose (Mathern *et al.*, 1996). A etiologia desta IPI é diversa sendo que, em adultos, as mais freqüentes são trauma, infecção no SNC e problemas perinatais (Reynolds *et al.*, 2005). Segue-se a ocorrência da IPI um período silente que normalmente dura até a adolescência, quando então as crises recorrem (Pitkanen e Sutula, 2002; Mathern *et al.*, 2002). Estes pacientes podem ainda apresentar comprometimento cognitivo e neuropsicológico progressivo (Fuerst *et al.*, 2001). Em imagens obtidas através de ressonância nuclear magnética (RNM) o hipocampo destes pacientes é caracterizado pela perda de volume (atrofia hipocampal) nas seqüências ponderadas em T1 e aumento de sinal nas seqüências ponderadas em T2 (Berkovic *et al.*, 1991; Cendes *et al.*, 1993; Briellmann *et al.*, 2002).

### **Alterações patológicas na população neuronal**

O mais comum substrato patológico encontrado na epilepsia do lobo temporal mesial é a esclerose hipocampal (Beach *et al.*, 1995), que é encontrada em aproximadamente 66% dos pacientes com ELT.

Macroscopicamente, a esclerose hipocampal é caracterizada por redução volumétrica e endurecimento do hipocampo (Dam, 1980). Esta atrofia hipocampal, embora se apresente de forma unilateral na maioria dos pacientes, pode ocorrer bilateralmente (French *et al.*, 1993, Engel, Jr. *et al.*, 1997). A atrofia hipocampal unilateral pode ser difusa, anterior ou posterior. A atrofia unilateral difusa é a forma mais comum de atrofia e a mais frequentemente associada à farmacorresistência (Van Paesschen, 2004). A atrofia bilateral é observada em 10% dos casos de ELT farmacorresistente (Van Paesschen, 2004).

Na avaliação microscópica, identifica-se perda neuronal intensa em CA1, no

prosubículo, no hilo da *fascia dentata*, em CA4 e CA3 e perda menos intensa na camada de células granulares, com relativa preservação de CA2 e dos córtices subicular e entorrinal (Margerison e Corsellis, 1966; Babb *et al.*, 1984, 1991; Mathern *et al.*, 1996). Este padrão de perda neuronal é o mais observado na esclerose hipocampal, porém em alguns casos a perda pode restringir-se à região hilar (Swartz *et al.*, 2006), neste caso sendo chamada de esclerose do *endfolium*. Estudos quantitativos de RNM têm evidenciado associação entre o grau de perda de volume hipocampal e o grau de perda celular detectado nas avaliações neuropatológicas (Van Paesschen *et al.*, 1997; Vossler *et al.*, 1998; Kuzniecky *et al.*, 2001). Associado à perda neuronal ocorre o brotamento anormal dos axônios das células granulares, as fibras musgosas, na camada molecular interna da *fascia dentata* (Babb *et al.*, 1984, 1991; Sutula *et al.*, 1989; Leite *et al.*, 1996). Esta reorganização é observável tanto em modelos experimentais como em pacientes com ELTM (Tauk e Nadler, 1985; Sutula *et al.*, 1989; Babb *et al.*, 1991; Mathern *et al.*, 1993; Mello *et al.*, 1993; Mathern *et al.*, 1995b), sendo visualizável através da histoquímica de Neo-Timm, que marca o zinco vesicular presente nas sinapses das fibras musgosas (Perez-Clausell e Danscher, 1985; Babb *et al.*, 1991; Mathern *et al.*, 1994).

Apesar de a morte neuronal observada na esclerose hipocampal ser correlacionada à ocorrência de IPI (Mathern *et al.*, 1995a) estudos experimentais e em humanos indicam que longa história de crises epiléticas pode causar perda neuronal (Tasch *et al.*, 1999; Mathern *et al.*, 2002; Pitkanen e Sutula, 2002; Roch *et al.*, 2002; Fabene *et al.*, 2003; Nairismagi *et al.*, 2004). Alguns dos achados que confirmam a progressão da perda neuronal são a associação entre o grau de perda e a frequência de crises generalizadas secundariamente, o início mais cedo das crises recorrentes, a duração da epilepsia, além do fato de que a esclerose em epilepsia diagnosticada na vida adulta é menos grave do que a esclerose encontrada em longo tempo de epilepsia (Van Paesschen, 2004).

### **Zinco e morte neuronal**

Grande parte das sinapses glutamatérgicas da formação hipocampal, como as fibras musgosas das células granulares e sinapses dos neurônios piramidais nos estratos oriens e radiatum do

cornu de Amon e no subículo, possuem zinco (Frederickson *et al.*, 1989; Perez-Clausell, 1996; Frederickson *et al.*, 2000). Durante a atividade neuronal, o zinco vesicular é liberado junto com o glutamato (Assaf e Chung, 1984; Howell *et al.*, 1984; Charton *et al.*, 1985; Sloviter, 1985; Aniksztejn *et al.*, 1987) e pode agir como neuromodulador.

O papel do zinco nas sinapses é complexo, pois age tanto para favorecer como para reduzir a excitotoxicidade da neurotransmissão glutamatérgica. Por exemplo, o zinco potencializa correntes mediadas por receptores AMPA (Peters *et al.*, 1987; Rassendren *et al.*, 1990), inibe correntes GABA<sub>A</sub> (Westbrook e Mayer, 1987), potencializa correntes ativadas por ATP (Cloues *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993), inibe correntes catiônicas levando ao aumento da excitabilidade da membrana celular (Nakazawa *et al.*, 1995), inibe a ativação de receptores NMDA (Westbrook e Mayer, 1987) e potencializa a atividade de receptores de glicina (Laube *et al.*, 1995).

Após atividade neuronal intensa o zinco vesicular, em concentração ao redor de 300µM (Frederickson *et al.*, 2004), é liberado rapidamente nas sinapses, e estudos experimentais têm demonstrado que, nessas concentrações, o Zn tem efeitos deletérios para as células, de acordo com o tempo de exposição (Weiss *et al.*, 2000; Colvin *et al.*, 2003). Em altas concentrações o Zn promove o aumento da liberação de neurotransmissores (Bancila *et al.*, 2004), a formação de radicais livres, a inibição de peroxidases e redutases (Kim *et al.*, 1999), e induz apoptose (Treiber, 2005; Frederickson *et al.*, 2005a; Colvin *et al.*, 2003) ou necrose (Kim *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 2000; Frederickson *et al.*, 2005b). Experimentos com quelação do Zn indicam que este a redução do Zn livre é importante para a redução da morte neuronal (Koh *et al.*, 1996; Suh *et al.*, 2000). Visto que a formação hipocampal apresenta alta concentração de zinco (Frederickson *et al.*, 1989; Frederickson *et al.*, 2000), que este metal está ligado à modulação da excitabilidade neuronal (Pei e Koyama, 1986; Wright, 1986; Fukahori e Itoh, 1990; Mitchell e Barnes, 1993) e que em pacientes com ELT há aumento da concentração de Zn vesicular nas regiões CA3-1, subículo e córtex entorrinal (Terra *et al.*, 1997), além da reorganização das fibras musgosas de pacientes, este metal apresenta importância fundamental na patofisiologia da epilepsia.

### **Metalotioneínas**

As metalotioneínas (MT) são proteínas de 6 a 7 KDa, ricas em cisteína, que ligam metais intracelulares e estão presentes em ampla variedade de espécies e tecidos (Kille *et al.*, 1994). A expressão das MT-I/II é induzida principalmente nos astrócidos e, em menor grau, em neurônios, micróglia e endotélio vascular (Wiese *et al.*, 2006) por metais como Zn (Ebadi *et al.*, 1995), interleucinas (Ebadi *et al.*, 1995; Takeda, 2001; Penkowa *et al.*, 2001), glicocorticóides e hormônios (Ebadi *et al.*, 1995). Por serem controladas por moléculas envolvidas na fase aguda de inflamação, as MT-I/II são classificadas como proteínas desta fase, tendo sua expressão aumentada até poucas horas ou dias após a injúria (Pazdernik *et al.*, 2001; Lukasiuk e Pitkanen, 2004; Kim *et al.*, 2004; Chung e West, 2004). Entretanto, vários estudos encontraram associações entre alterações na expressão das MT-I/II e a patogênese de algumas doenças crônicas como a doença de Alzheimer (Carrasco *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2006), a doença de Parkinson (Ebadi *et al.*, 2005), a isquemia focal (van Lookeren *et al.*, 1999) e a esclerose lateral amiotrófica (Ebadi *et al.*, 1995).

Estudos experimentais demonstram que, quando os níveis de Zn aumentam lentamente, é também aumentada a expressão das MT-I/II (Ebadi *et al.*, 1995; Colvin *et al.*, 2003). Os resultados de outros estudos sugerem que estas proteínas formam parte de mecanismos endógenos de neuroproteção em condições associadas à toxicidade por zinco. Por exemplo: 1) o camundongo transgênico que sobre-expressa MT-I é protegido contra isquemia cerebral focal (van Lookeren *et al.*, 1999) e apresenta menor resposta inflamatória e morte neuronal após crises epiléticas induzidas por ácido caínico (Penkowa *et al.*, 2005), e, 2) o camundongo deficiente em MT-I/II apresenta pouca recuperação funcional após isquemia cerebral e infartos cerebrais de grande volume em comparação com os animais controles, (Trendelenburg *et al.*, 2002).

### **Alterações patológicas na população glial**

Além da alteração volumétrica, observa-se na RNM de pacientes com ELT aumento de sinal nas sequências ponderadas em T2 (Berkovic *et al.*, 1991; Cendes *et al.*, 1993; Briellmann *et al.*, 2002) e alterações no coeficiente de difusão (Wiesmann *et al.*, 1999), que são tidas como

indicativas de gliose e edema tecidual. A gliose é uma alteração encontrada em vários modelos animais, como abrasamento, crises químicas (Uhlmann *et al.*, 2002; Kralic *et al.*, 2005), epilepsia por manipulação genética (Leon Chavez *et al.*, 2001; Drage *et al.*, 2002), bem como em pacientes humanos submetidos à lobectomia (Salanova *et al.*, 1999; Proper *et al.*, 2001; Swartz *et al.*, 2006; Prayson e Yoder, 2007), ocorrendo tanto em ELT com esclerose hipocampal quanto ELT lateral (Dawodu e Thom, 2005). Logo após uma injúria aguda, ocorre ativação microglial, seguida de hipertrofia e proliferação dos astrócitos. A reação glial inicia-se antes da ocorrência da morte neuronal (Uhlmann *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2006), visando reparar o tecido e impedir danos neuronais. Estudos com abrasamento em ratos El indicam que esta reação pode ocorrer mesmo sem brotamento axonal ou morte neuronal (Drage *et al.*, 2002), podendo assim ser importante sobre a gênese das crises (Pitkanen e Sutula, 2002).

Em condições inflamatórias, as micróglia limpam resíduos, produzem fatores de crescimento e citocinas de controle da inflamação, e durante o desenvolvimento controlam a morte neuronal programada (Block *et al.*, 2007). Em epilepsia, a despeito de alguns trabalhos mostrarem que voltam rapidamente aos níveis basais (Benkovic *et al.*, 2006), estudos comprovaram que a microgliose pode ser mantida nos processos crônicos e são encontradas em hipocampos submetidos à lobectomia (Borges *et al.*, 2003; Boer *et al.*, 2006; Chakir *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2006; Block *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2009). Com a ativação, as micróglia passam inicialmente para um estado hiper-ramificado, tornando-se finalmente fagócitos (Drage *et al.*, 2002; Bonde *et al.*, 2006). Ocorrem ainda mudanças na expressão de proteínas, como transportadores (Chakir *et al.*, 2006) e citocinas (Lee *et al.*, 2002). Em especial, a produção da citocina IL-1 $\beta$ , que é estimulada pelas crises, pode estimular a susceptibilidade às mesmas (Borges *et al.*, 2003). Ainda, a interpretação errônea de estímulos inócuos e sua estimulação pela astrocitose, morte neuronal tardia ou pelas crises (que promovem a liberação de ATP) levam à sua hiperatividade, condição em que promovem a neurodegeneração e

cronificação ao produzirem excesso de moléculas danosas, como TNF $\alpha$  e radicais livres (Drage *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2003; Rappold *et al.*, 2006; Block *et al.*, 2007).

Os astrócitos são células cruciais para o funcionamento de todo o tecido nervoso, afetando vários processos. Estas células promovem a formação das sinapses, limpam-nas de neurotransmissores e moléculas após a transmissão sináptica, controlam os níveis de moléculas e íons no espaço extracelular (EEC), secretam proteínas da matriz extracelular, são constituintes da barreira hematoencefálica e criam barreira entre o parênquima nervoso e a pia, a *glia limitans* (Khurgel e Ivy, 1996; Wong *et al.*, 2003; Borges *et al.*, 2003; Da e Verkman, 2004). Por participar de todos estes processos, sua desregulação, como ocorre na gliose, pode promover as mudanças patogênicas envolvidas na esclerose hipocampal. Como exemplo de sua participação na manutenção tecidual, Kang e colaboradores (Kang *et al.*, 2006) mostraram que, com a morte glial logo após *status* por pilocarpina, ocorre brotamento axonal, processo antes inibido pelos astrócitos.

Várias evidências indicam que estas células são importantes no processo de epileptogênese: 1) em modelos de crises por ácido cáínico, a maioria das células sobreviventes são astrócitos (Kralic *et al.*, 2005); 2) em modelos de crises por abrasamento, ocorre astrogliose sem neurodegeneração ou microgliose (Khurgel e Ivy, 1996); 3) o bloqueio da neurodegeneração não impede a progressão da epilepsia (Kang *et al.*, 2006); 4) a aplicação de L $\alpha$ -aminoadipato (toxina que mata seletivamente astrócitos) reduz crises comportamentais em ratos Long-Evans submetidos ao abrasamento da amígdala (Vessal *et al.*, 2005).

Em nível molecular, a excitabilidade alterada na epilepsia foi ligada aos astrócitos por vários trabalhos. Em modelos de esclerose tuberosa, foram relatados redução de transportadores de glutamato *in vivo* e de sua corrente em astrócitos em cultura e fatias (Wong *et al.*, 2003) e em abrasamento e *status* químico foi visto redução na expressão dos transportadores e receptores deste neurotransmissor nos astrócitos (Drage *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2003), indicando que esta molécula pode acumular-se no foco das crises e promover maior excitabilidade neuronal. Estão ainda relacionados à hipsincronia, por liberação de glutamato (Binder e Steinhauser, 2006; Chakir *et al.*, 2006) e por possuírem mais junções comunicantes, em estudos em hipocampos de pacientes epiléticos, mas não em modelos de

*status* por ácido cáínico (Khurgel e Ivy, 1996). Os astrócitos afetam o tamponamento do potássio ( $K^+$ ) e o volume do EEC (McNamara, 1994; Borges *et al.*, 2003), ambos com efeito sobre o funcionamento neuronal. O acúmulo de  $K^+$  no meio extracelular, que pode ocorrer por bloqueio de seus canais, promove descargas epileptiformes severas e prolongadas (Beck *et al.*, 1996). Estudos *in vivo* em gatos e em fatias em ratos mostraram que esta desregulação na homeostase do  $K^+$  pode promover excitabilidade neuronal e crises (McNamara, 1994). Com o aumento do  $K^+$  extracelular, a membrana celular tem seu potencial próximo ao limiar, facilitando os disparos, e com a redução do efluxo de  $K^+$  causada por este aumento extracelular ocorre inchaço celular (edema citotóxico), redução do EEC e aumento da sincronização dos potenciais de ação (McNamara, 1994). A atuação dos astrócitos na homeostase do Zn também indica que sua desregulação pode afetar a excitabilidade neuronal (Mocchegiani *et al.*, 2005).

#### **Alterações na homeostase da água**

O volume do EEC tem papel importante na excitabilidade neuronal, sendo que sua redução pode influenciar a excitabilidade do tecido (Binder *et al.*, 2004; Verkman *et al.*, 2006), permitindo aumento da concentração de íons no meio extracelular e passagem direta de estímulos entre as células (McNamara, 1994). Deste modo, alterações neste espaço podem ser importantes na geração e manutenção da excitabilidade exacerbada que ocorre nas crises epiléticas. Além de afetar a excitabilidade, o volume do EEC pode afetar o volume hipocampal.

As aquaporinas (AQP) são proteínas que funcionam como canais que permitem o trânsito de água entre as células e o meio extracelular em diversos tecidos (Agre *et al.*, 2002). A isoforma mais abundante no tecido nervoso, conhecida como AQP4, é expressa nos endimócitos, nas células endoteliais cerebrais e nos prolongamentos astrocíticos que envolvem o endotélio vascular, a fenda sináptica e que formam a *glia limitans*, (Rash *et al.*, 1998; Furman *et al.*, 2003; Nagelhus *et al.*, 2004; Guérin *et al.*, 2005; Verkman *et al.*, 2006). Estudos experimentais demonstraram que alterações na expressão de AQP4 contribuem para a geração de edema vasogênico (Papadopoulos *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Verkman *et al.*,

2006; Binder *et al.*, 2004; Da e Verkman, 2004; Solenov *et al.*, 2004; Papadopoulos e Verkman, 2005; Wang *et al.*, 2006; Guérin *et al.*, 2005). Estudos do hipocampo de pacientes com ELT submetidos ao tratamento cirúrgico encontraram alterações na expressão da AQP4 (Binder e Steinhauser, 2006) e, em modelos experimentais de epilepsia, alterações da expressão da AQP4 estão associadas a alterações do limiar, duração e severidade de crises epiléticas (Papadopoulos *et al.*, 2004; Verkman, 2005; Binder *et al.*, 2006; Verkman *et al.*, 2006; Nesic *et al.*, 2006). Deste modo, a expressão de AQP4 pode afetar tanto a gênese das crises como ser um fator importante nas alterações de volume observadas no hipocampo epileptogênico.

Além de afetar o funcionamento do tecido, a astrogliose altera a proporção de matriz extracelular (MEC) no tecido, aumentando a produção de seus constituintes. Este aumento dos componentes da matriz atrai mais água para o tecido e aumenta o volume do espaço extracelular (Heck *et al.*, 2004; Sykova *et al.*, 2005). A MEC corresponde a aproximadamente 20% do tecido cerebral (Davson e Spaziani, 1959; Sykova, 2004; Hawkins e Davis, 2005), sendo rica em proteoglicanos e glicosaminoglicanos hidrofílicos e pobre em proteínas fibrosas (Costa *et al.*, 2007; Galtrey e Fawcett, 2007). A matriz coordena o desenvolvimento do córtex, controla plasticidade tecidual (Heck *et al.*, 2004; Sykova *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2008), excitabilidade neuronal (Galtrey e Fawcett, 2007) e aprendizado (Meighan *et al.*, 2006; Galtrey e Fawcett, 2007), serve como tampão para íons e neurotransmissores (Laurent e Fraser, 1992; Sykova *et al.*, 2005; Vitellaro-Zuccarello *et al.*, 2005) e tem papel importante na homeostase da água (Hawkins e Davis, 2005; Vitellaro-Zuccarello *et al.*, 2005). A degradação da MEC por metaloproteinases de matriz (MMP) é associada ao aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica em situações patológicas (Hawkins e Davis, 2005; Kawakita *et al.*, 2006; Swann *et al.*, 2007), afetando ainda o volume do EEC e o coeficiente de difusão aparente da água (Heck *et al.*, 2004; Sykova *et al.*, 2005). Outra ação da MEC sobre a homeostase da água está na expressão, organização e correta polimerização da proteína AQP4, que atua no transporte de água no SNC (Guadagno e Moukhles, 2004; Noell *et al.*, 2007). O ácido hialurônico (AH) é um glicosaminoglicano altamente hidrofílico (Laurent e Fraser, 1992), secretado pelas células gliais (Costa *et al.*, 2007), que serve de arcabouço de

deposição da MEC (Knudson e Knudson, 1993). Este polímero se acumula em vários tecidos durante processos inflamatórios, promovendo edema (Laurent e Fraser, 1992) e, durante o desenvolvimento do SNC, a redução da concentração de AH na MEC se correlaciona com o estreitamento do EEC (Knudson e Knudson, 1993). Os proteoglicanos tipo condroitin sulfato (CSPG) são os principais constituintes da MEC do SNC (Laurent e Fraser, 1992; Vitellaro-Zuccarello *et al.*, 2005), sendo produzidos por células gliais (Okamoto *et al.*, 2003) e tendo alta associação ao movimento da água no EEC. Após injúria do tecido, ocorre gliose e aumento dos níveis de CSPG, o que causa o aumento do volume e da tortuosidade do EEC, reduzindo a difusão da água (Vorisek *et al.*, 2002; Sykova, 2004) por uma vasta área, que extrapola os limites da injúria (Vorisek *et al.*, 2002). Além destas evidências, alguns trabalhos indicaram que regiões com baixos níveis de AQP4 têm MEC rica em CSPG e AH que agiriam como mecanismos complementares para facilitar a difusão da água (Vitellaro-Zuccarello *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2007). Na epilepsia, estudos clínicos e experimentais indicam que ocorrem alterações na MEC que afetariam plasticidade tecidual e homeostase da água. Dentre as modificações, alterações em CSPG foram ligadas à dispersão de neurônios granulares, reorganização axonal e aumento na densidade de espinhas dendríticas (Kurazono *et al.*, 2001; Heck *et al.*, 2004), enquanto o aumento dos níveis de AH parece promover reorganização axonal (Bausch, 2006). As alterações nos níveis e tipos de CSPG tornam a MEC semelhante à matriz do período embrionário, o que pode ser o motivo da plasticidade tecidual (Okamoto *et al.*, 2003). Em pacientes com ELTM, foi documentado o aumento de CSPG e AH, que foram ligados à excitabilidade e reorganização axonal (Perosa *et al.*, 2002).

### **Justificativa**

Dados preliminares de nosso laboratório (Peixoto-Santos *et al.*, 2008a; Peixoto-Santos *et al.*, 2008b) sugerem que a perda neuronal, a reorganização axonal e a expressão de MT-I/II não refletem alterações volumétricas vistas por RNM no hipocampo de pacientes com ELT. Considerando estes resultados e os dados da literatura expostos, propomos: 1) que a alteração do volume hipocampal pode estar associada a alterações na expressão de proteínas envolvidas nos mecanismos de regulação do conteúdo de água no líquido extracelular do cérebro, como

aquaporina-4 (AQP-4), ácido hialurônico (AH) e condroitin sulfato (CSPG), bem como com outras populações celulares hipocâmpais que não a neuronal (i.e., micróglia e astrócitos); e, 2) que a expressão das MT-I/II no hipocampo de pacientes com ELT pode ser associada a diferenças na resposta glial que ocorre durante o processo de epileptogênese, independentes da perda neuronal.

## **2. OBJETIVOS**

O principal objetivo deste projeto foi avaliar na formação hipocampal de pacientes com ELT e diferentes graus de atrofia hipocampal, avaliada por RNM: 1) densidade neuronal; 2) padrão de astrogliose e microgliose; 3) expressão das metalotioneínas I/II; 4) expressão de aquaporina 4 e das moléculas de MEC condroitin sulfato e ácido hialurônico; e 5) correlacionar os achados de imunohistoquímica com os dados de morfometria hipocampal da RNM (volume e área hipocampal).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Pacientes e procedimento clínico-patológico de ELT**

Pacientes com crises parciais complexas fármaco-resistentes originadas pelo lobo temporal foram avaliados pelo Centro de Cirurgia de Epilepsia (CIREP) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP utilizando protocolos padronizados e previamente publicados (Engel, Jr. *et al.*, 1991; Engel, Jr., 1993). A abordagem diagnóstica presume que as crises do lobo temporal iniciam na região de dano cerebral ou em regiões adjacentes e que estas regiões podem ser localizadas por meio da identificação da estrutura com hiperexcitabilidade e déficits funcionais. A consideração sobre a terapia cirúrgica foi baseada na localização de uma área única para ressecção, não requisitando necessariamente uma injúria cerebral inicial ou crises na infância como critério de inclusão. A avaliação incluiu: detalhada história pregressa e exames neurológicos; EEG de escalpo/esfenoidal interictal e ictal; extensa bateria de testes neuropsicológicos; injeção de amital sódico em ambas as carótidas (teste de Wada) para avaliação da memória (quando necessário) e representação da fala; além de detalhada avaliação neurorradiológica utilizando tomografia computadorizada e RNM de alta resolução, com protocolos especiais para visualização da formação hipocampal (Leite *et al.*, 2000). Os pacientes foram adicionalmente submetidos à avaliação funcional da atividade cerebral utilizando tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT). Quando os dados desta avaliação (não invasiva) localizaram a região temporal anterior como a região de origem das crises, os pacientes foram submetidos a remoção "em bloco" da região temporal anterior, incluindo 3 a 4 cm do hipocampo (Crandall, 1987).

#### **3.2 Aspectos éticos/consentimento do paciente**

Os passos técnicos para a realização da lobectomia temporal estão amplamente publicados na literatura e o procedimento vem sendo utilizado há mais de 30 anos (Hill *et al.*, 1953; Falconer *et al.*, 1955). O risco de complicação cirúrgica é considerado baixo, principalmente por se tratar, na maioria dos casos, de uma cirurgia eletiva e não haver efeito de massa na estrutura a ser removida. No entanto, todos os pacientes candidatos à cirurgia foram informados pela equipe cirúrgica a respeito destes riscos e foi discutido o prognóstico do

controle de crises com ou sem intervenção cirúrgica. Todos os dados de exames neurológicos, psicológicos e clínicos foram arquivados e a confidencialidade destas informações assegurada. Em caso de publicações, toda e qualquer informação pessoal será omitida. Uma vez esclarecido sobre estes procedimentos, o paciente então assinou um termo de consentimento autorizando a utilização do material biológico cirúrgico para este estudo. Todos os protocolos diagnósticos e de conduta cirúrgica estão baseados em estudos visando otimizar o controle de crises sem que isto acarrete em prejuízos cognitivos permanentes. A aplicação destes protocolos possibilitou a realização deste projeto, assegurando que nenhum procedimento feito leve a um comprometimento do bem estar do paciente.

Parte do material utilizado neste projeto foi obtido do Banco de Tecido Cerebral, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP-USP (processo HCRP No. 9370/2003) e parte foi coletado prospectivamente, sendo que a utilização destes casos foi submetida à aprovação do Comitê de Ética (processo CAAE 0129.0.004.000-08 e HCRP No. 2634/2008) e o uso do material ocorreu após a aprovação, por Termo de Consentimento, pelos pacientes operados para tratamento de ELT. O material restante foi incorporado ao Banco de Tecido Cerebral do Laboratório de Investigação em Epilepsia.

### **3.3. Grupos de pacientes**

Os pacientes com ELT foram classificados em dois grandes grupos, da seguinte forma: 1) pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial e volumetria por RNM (ELTM, n=69), sem outras alterações patológicas que não a esclerose hipocampal; 2) grupo formado por pacientes com tumor cerebral ou displasia associada à ELT (TD, n=20). O grupo controle (Ctrl) foi constituído por pacientes com idade semelhante à dos grupos anteriores, que falecerem de causas não associadas à patologia cerebral (n=20). Os pacientes do grupo ELTM foram subdivididos em três grupos, de acordo com a volumetria na RNM: a) pacientes com volume hipocampal normal (VN, volume mínimo de 2,5cm<sup>3</sup>, n=22); b) pacientes com atrofia hipocampal leve (AL, volume entre 2,5 e 2cm<sup>3</sup>, n=26); c) pacientes com atrofia hipocampal grave (AG, volume menor que 2cm<sup>3</sup>, n=21). As classificações dos pacientes nestes três grupos seguem parâmetros de Araújo (2003), onde os grupos foram definidos de acordo com a média

e desvios-padrão (DP) de volume hipocampal de voluntários sem alterações neurológicas, com volume hipocampal no grupo VN dentro do intervalo média $\pm$ 2DP do controle, volumes inferiores ou iguais à média-2DP e superiores média-3DP no grupo AL e volumes iguais ou inferiores à média-3DP no grupo AG. Todas as medidas de volume foram feitas às cegas para a lateralização das crises e quaisquer outras avaliações volumétricas prévias.

Os critérios de inclusão foram: idade entre 20 e 80 anos (exceto para tumor/dislplasia, onde a idade poderia ser inferior a 20 anos); diagnóstico de epilepsia do lobo temporal para os pacientes dos grupos ELTM e T/D; exame de RNM com volumetria hipocampal para o grupo ELTM; presença de tumor ou displasia na região temporal, independente de existência de esclerose hipocampal confirmada pelo SERPAT, para o grupo T/D.

Os critérios de exclusão foram: EEG com paroxismos epileptiformes extra-temporais ou generalizados para todos os grupos; acentuado prejuízo cognitivo nos testes neuropsicológicos para os grupos ELTM e T/D; histórico de quaisquer problemas neurológicos *ante-mortem* para o grupo Ctrl; existência de patologia neurológica no exame *post-mortem* para o grupo Ctrl; tempo *post-mortem* superior a 10 horas para o grupo Ctrl.

Secções do hipocampo de todos os grupos foram processadas para avaliação de: 1) densidade neuronal, utilizando imunohistoquímica para NeuN; 2) grau de astrogliose e microgliose, através de imunohistoquímicas para GFAP e HLA-DR, respectivamente; 3) alterações da MEC, através de imunohistoquímica para condroitin sulfato e histoquímica para ácido hialurônico; 4) expressão das proteínas MT-I/II e AQP4, através de imunohistoquímica.

Estas avaliações foram correlacionadas com os dados volumétricos quantitativos de RNM, devidamente corrigidos para cada indivíduo, bem como a área média, em corte coronal, do corpo do hipocampo extraído, visando assim definir qual destes parâmetros correlacionar-se-ia melhor com as alterações patológicas.

### **3.4. Coleta e processamento do tecido**

Os cérebros dos pacientes do grupo controle foram coletados durante a necropsia, removidos da caixa craniana e os lobos temporais e hipocampos foram dissecados. Todas as amostras de tecido foram obtidas em tempo *post-mortem* inferior a 10 horas. O tecido hipocampal

removido durante a cirurgia para tratamento da ELT foi recebido na sala operatória e imediatamente colocado em solução salina gelada, para subsequente transporte ao laboratório. Os espécimens foram cortados em fatias de 2 mm de espessura utilizando navalha de corte histológico. Parte do tecido retirado na cirurgia foi enviado ao Serviço de Patologia (SERPAT), para emissão de laudo sobre a biópsia e parte foi processado e incorporado ao banco de tecido cerebral do Laboratório de Investigação em Epilepsia, sendo este último tecido o utilizado neste estudo.

Um fragmento hipocampal foi fixado por imersão em formol 10% em PBS 0,1M durante sete dias e incluído em parafina. Para este último processo, o tecido foi desidratado, diafanizado e imerso em parafina. A inclusão foi concluída por esfriamento do tecido imerso em parafina a 4 °C. Os blocos foram cortados em secções com espessura de 8 µm que foram colocadas em lâminas previamente gelatinizadas.

### **3.5. Histologia**

#### **3.5.1. Imunohistoquímica / Histoquímica**

A gliose foi avaliada através da expressão de GFAP (astrocitose) e de HLA-DR (microgliose) e a população neuronal foi estudada pela expressão de NeuN. Foram também avaliadas a localização e expressão das proteínas MT-I/II e da AQP4. A matriz extracelular foi avaliada através pela expressão de CS-56 por imunohistoquímica e de ácido hialurônico (pela proteína HABP) por histoquímica. Segundo o protocolo de imunohistoquímica do laboratório (adaptado de Martins *et al.*, 1999) as secções foram submetidas a bloqueio da peroxidase endógena com 4,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBS 50mM pH 7,4 e à recuperação antigênica em microondas Brastemp DES com tampões citrato de sódio 10mM pH 6 (para GFAP e AQP4) ou Tris-HCL 50mM pH 9,6 (para NeuN, HLA-DR, MT-I/II e CS-56). Após a recuperação as secções passaram por bloqueio de grupos aldeído livres com de Tris-glicina 0,1M pH 7,4 por 45 minutos, seguido de tampão de bloqueio com leite desnatado e soro de cabra (#S-1000, Vector<sup>®</sup>) em tampão PBS-Triton por quatro horas. As secções foram incubadas com anticorpos primários em tampão de bloqueio por 16 horas. Foram utilizados anticorpos primários monoclonais produzidos em camundongo anti-GFAP humano (clone 6F2, #M0761,

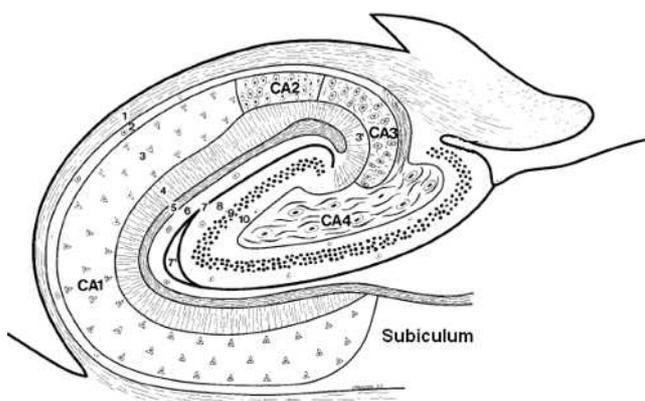
Dako<sup>®</sup>), anti-NeuN murino (clone A60, #MAB377, Chemicon<sup>®</sup>), anti-HLA-DR humano (clone TAL.1B5, #M0746, Dako<sup>®</sup>), anti-MT-I/II equina (clone E9, #M0639, Dako<sup>®</sup>) e anti-CS-56 galináceo (clone CS-56, #C8035, Sigma<sup>®</sup>) e o anticorpo policlonal produzido em coelhos anti-aquaporin-4 humana, (#sc-20812, Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>), diluídos em tampão de bloqueio nas concentrações de 1:500, 1:500, 1:100, 1:500, 1:100 e 1:200, respectivamente. Em seguida, foi realizada incubação com anticorpos secundários também em tampão de bloqueio. Os anticorpos secundários biotinizados utilizados foram o anticorpo produzido em coelho anti-IgG murino (#E0354, Dako<sup>®</sup>) e produzido em porco anti-IgG cunicular (#E0353, Dako<sup>®</sup>), ambos na diluição 1:200. A visualização da proteína imunolocalizada foi realizada utilizando-se complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain Elite ABC kit, #PK6100, Vector<sup>®</sup>) e cromógeno *3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB, #34001, Pierce Biotechnology<sup>®</sup>). Os tempos de revelação em solução de DAB foram de 12' para HLA-DR, 10'30" para NeuN, 8' para MT-I/II e GFAP, 5' para AQP4 e CS-56.

Para a detecção de ácido hialurônico, foi realizada histoquímica utilizando-se proteína ligante de ácido hialurônico biotinizada (HABP, #385911, Calbiochem<sup>®</sup>). As etapas da histoquímica foram as mesmas das imunohistoquímicas, exceto pelo anticorpo secundário, não necessário para a reação. A recuperação antigênica foi realizada em citrato 10mM pH 6, a proteína ligante foi diluída em tampão de bloqueio na concentração 1:26 e a revelação durou 12'.

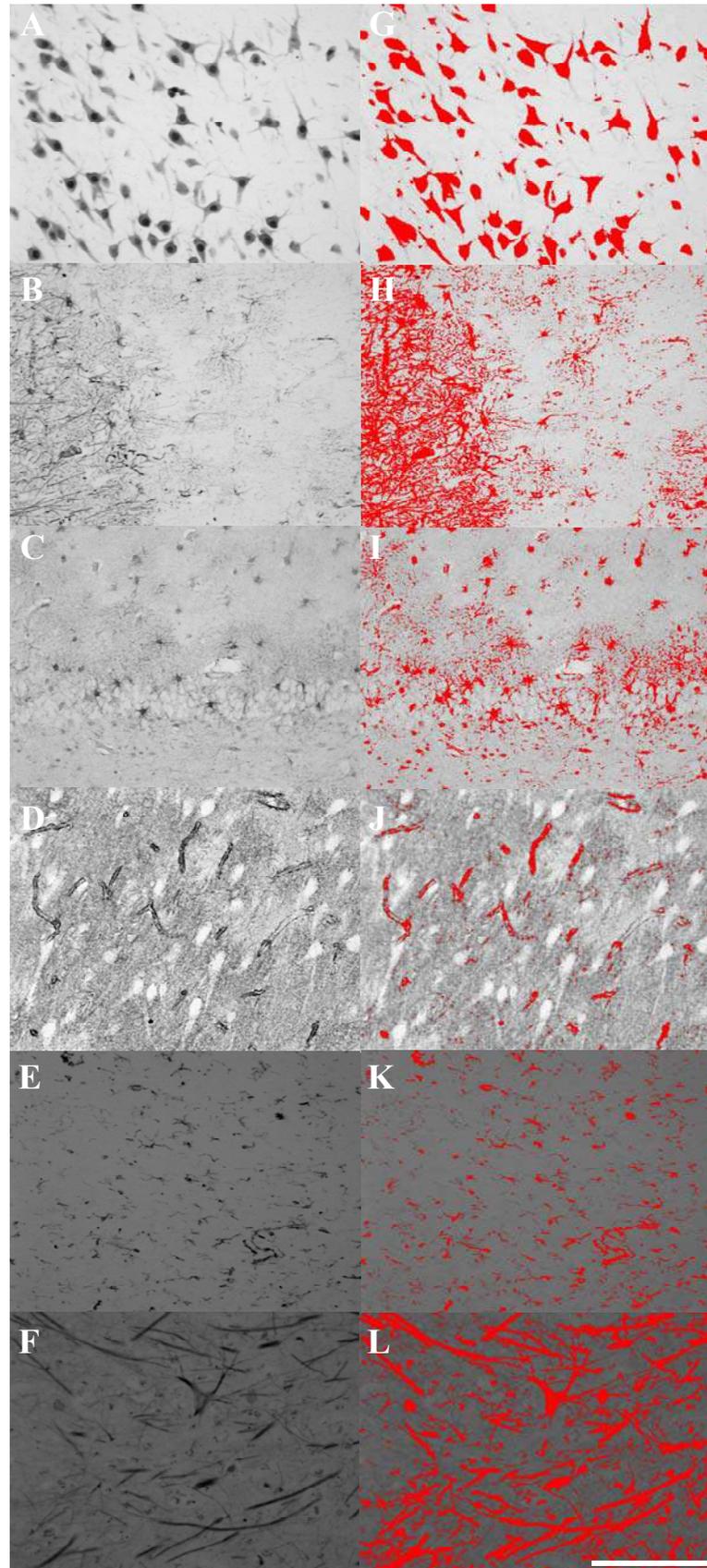
Para a avaliação qualitativa da co-localização de astrócitos com MT-I/II ou com AQP4 foram utilizados anticorpos policlonal anti-GFAP (#AB5804, Chemicon<sup>®</sup>), para co-localizar astrócitos com MT-I/II, e monoclonal anti-GFAP (clone 6F2, #M0761, Dako<sup>®</sup>), para co-localizar astrócitos com AQP4. Os anticorpos secundários utilizados para a visualização foram anticorpos caprinos conjugados com Texas Red contra IgG de coelho (#T2767, Molecular Probes<sup>®</sup>) e IgG de camundongo (#T862, Molecular Probes<sup>®</sup>) e conjugados com AlexaFluor 488 contra IgG de coelho (#A11008, Molecular Probes<sup>®</sup>) e de camundongo (#A11001, Molecular Probes<sup>®</sup>). A imunohistoquímica foi a mesma realizada para anticorpos biotinizados, exceto pelo bloqueio da peroxidase endógena, etapa desnecessária para imunofluorescência.

### 3.5.2. Análise da intensidade da marcação das imunohistoquímicas

Para as medidas semi-quantitativas, as imagens da região de interesse, com aumento de 100x, foram coletadas por uma câmara monocromática CCD de alta resolução (modelo C2400-75H, Hamamatsu) instalada a um microscópio *Olympus BX60* e convertidas em sinais digitais e alimentadas a um computador *MacIntosh* (Modelo G3) usando um programa de análise de imagem (*NIH image*, 1.62c). A iluminação foi mantida uniforme e estável durante todas as medidas e a intensidade de luz cuidadosamente ajustada entre cada avaliação, utilizando para isso padrões de densidade óptica (*Kodak, Rochester, N.Y.*). Imagens das áreas a serem analisadas foram salvas em formato TIF para análise em computador *Windows* com o software *ImageJ* 1.37c (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>, correspondente ao software *NIH Image*). Foram avaliadas as seguintes regiões: camada molecular externa, camada molecular interna, camada granular, camada subgranular, hilo e o estrato piramidal das regiões CA4, CA3, CA2, CA1, prosúbicula e subículo (Figura 1). Para todas as regiões foram utilizadas 12 áreas de  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  para amostragem. As imagens foram processadas pela ferramenta de limiar, onde o software marca pixels que possuam cor cinza igual ou superior ao limiar de marcação em vermelho, calculando então a área marcada em vermelho em cada área amostral. Este limiar (Figura 2) foi estabelecido através dos padrões encontrados nas secções de pacientes do grupo controle, para estabelecer qual era a marcação padrão de cada proteína. Para evitar variações existentes entre os ensaios de um mesmo anticorpo, cada ensaio teve seu limiar baseado nos valores dos controles presentes no ensaio. Um ajuste mais fino dos limiares foi realizado através de secções consecutivas de um mesmo caso presentes em cada ensaio.



**Figura 1.** Regiões hipocâmpais. 1: alveus; 2: stratum oriens; 3: stratum pyramidale; 3': stratum lucidum; 4: stratum radiatum; 5: stratum lacunosum; 6: stratum moleculare; 7: sulco hipocampal; 8: stratum moleculare; 9: stratum granulosum (camada granular); 10: camada polimórfica (subgranular). Adaptado de Duvernoy *The Human Hippocampus* (1988), p.20.



**Figura 2.** Imagens representativas das imunohistoquímicas de NeuN (A,G), GFAP (B,H), MT-I/II (C,I), AQP4 (D,J), HLA-DR (E,K) e CS-56 (F,L) com (G-L) e sem (A-F) o uso da função de limiar. A barra em L indica 200 $\mu$ m.

Os resultados foram apresentados como área marcada no texto e porcentagem de área marcada nos gráficos. Na imunohistoquímica de NeuN, nas mesmas amostras onde mediu-se a área marcada pelo anticorpo foram realizadas contagens neuronais, permitindo-se avaliar também a área celular média. Uma aproximação foi feita para a camada granular, uma vez que a avaliação da área foi feita em aumento de 100x e as contagens em aumento de 200x.

Para a avaliação do ácido hialurônico, foi medido o nível de cinza das regiões no lugar de quantificação da área, devido à homogeneidade de expressão desta molécula. Este valor de cinza foi corrigido subtraindo-se o valor de cinza da camada granular dos valores das demais camadas. A camada granular foi escolhida para esta correção por ser a que apresentava menor marcação de AH nos casos Ctrl.

Para a avaliação da co-localização, as imagens das imunofluorescências foram captadas em um microscópio confocal Leica TCS-SP5 AOBS acoplado à computador *Windows*, através do software Leica LAS-AF. Foram usados os lasers de Diodo, Argônio e Hélio/Neônio para excitar, respectivamente, o Hoechst 33342, AlexaFluor 488 e Texas Red.

### ***3.5.3. Contagem neuronal***

A contagem neuronal para cada região hipocampal foi realizada em seções de 8  $\mu\text{m}$  de espessura marcadas com NeuN. A contagem foi realizada no programa livre ImageJ 1.37c com aumento de 200x para a camada granular e de 100x para o estrato piramidal das demais regiões hipocampais. Foi aplicando o fator de correção de Abercrombie (1946) para espessura do corte, permitindo-se definir a densidade neuronal, com os valores apresentados em milhares de células por milímetro cúbico. A análise dos dados foi semelhante à descrita para os outros procedimentos histológicos.

## **3.6. Volumetria hipocampal**

Os pacientes do grupo ELTM foram redivididos em grupos menores de acordo com dados da volumetria hipocampal na RNM. Exames adquiridos em aparelho de 1.5T (Magnetom Vision, Siemens AG, Erlängen, Alemanha), com bobinas de gradiente de 25 mT, de polarização circular. Para a volumetria foi utilizada sequência gradiente echo 3D ponderada em T1 no

plano sagital, com 160 partições e espessura de corte de aproximadamente 0,9mm (TR: 9,7ms; TE: 4,0ms; flip angle: 12 graus; matriz: 256x256; FOV: 256mm). A aquisição foi sagital visando-se reduzir o tempo de aquisição. As imagens foram reformatadas em plano coronal, por protocolo Multiplanar Reformatting (MPR), em console auxiliar. Os cortes reformatados foram transferidos para computador pessoal, plataforma Windows, em formato MNC, sendo então analisadas com uso do aplicativo livre Display, parte do pacote de MNC-BIC desenvolvido pelo McConnell Brain Imaging Centre (<http://www.bic.mni.mcgill.ca/software/distribution/>, Universidade McGill, Montreal, Canadá).

Os limites da formação hipocampal (fascia dentata, hipocampo e subículo) foram definidos de acordo com protocolos de avaliação volumétrica utilizados pelos radiologistas do HCRP, baseados nos trabalhos de Pruessner e colaboradores (2000) e Bonilha e colaboradores (2004). A segmentação do hipocampo foi realizada manualmente, nos cortes coronais, com posteriores ajustes finos realizados em cortes sagitais e transversais. O hipocampo foi segmentado em cabeça, corpo e cauda e foram calculados o volume total do hipocampo (em  $\text{cm}^3$ ), a área coronal média das secções do corpo do hipocampo na RNM (em  $\text{cm}^2$ ) e o índice de atrofia ( $H_{\text{ipsi}}/H_{\text{contra}}$ ). Parte da presente casuística foi previamente avaliada pelo Dr. David Araújo e, em comparação com a volumetria realizada para nosso estudo, os pacientes em comum obtiveram a mesma classificação.

### 3.7. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos a teste para avaliar a normalidade e a igualdade de variâncias dos dados. Para as variáveis que cumpriram ambos os critérios foi utilizado teste paramétrico de análise de variância (ANOVA), com *post hoc* de Bonferroni. Quando pelo menos um dos critérios não foi cumprido, foi aplicado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn. Foram realizados testes de correlações entre as variáveis estudadas, utilizando-se o teste de Pearson quando  $n \geq 30$  e Spearman quando  $n < 30$ . Foram também realizadas regressões lineares simples e múltiplas. Todas as análises foram realizadas no programa SigmaStat 3.1, e os resultados foram considerados como significativos com um

nível de confiança de  $p < 0,05$ , sendo apresentados na forma média $\pm$ EPM ou mediana, de acordo com sua distribuição. Além do valor de  $p < 0,05$ , as correlações foram consideradas apenas se o coeficiente de correlação ( $r$ ) fosse, em módulo, igual ou superior a 0,4. Todos os gráficos foram feitos utilizando-se o programa Minitab 14.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Dados Clínicos

A idade média dos indivíduos foi de  $42 \pm 4$  anos no grupo Ctrl,  $35 \pm 2$  no grupo VN,  $39 \pm 2$  no grupo AL,  $40 \pm 2$  no grupo AG e  $28 \pm 3$  no grupo TD, com o grupo TD apresentando idade média menor que os grupos Ctrl, AL e AG ( $p=0,001$ ). Nos grupos ELT, a duração da epilepsia foi de  $23 \pm 2$  anos no grupo VN,  $27 \pm 2$  no grupo AL,  $26 \pm 2$  no grupo AG e  $16 \pm 3$  no grupo TD, sendo que a duração do grupo TD foi menor do que a dos grupos AL e AG ( $p=0,005$ ). A idade de início da epilepsia (i.e., idade de início das crises recorrentes espontâneas) foi de  $12 \pm 1$  anos no grupo VN,  $12 \pm 2$  no grupo AL,  $14 \pm 2$  no grupo AG e  $12 \pm 2$  no grupo TD, sem diferença entre os grupos ( $p=0,865$ ). A frequência mínima de crises foi de 6 crises/mês no grupo VN, 7 no grupo AL, 5 no grupo AG e 11 no grupo TD, sem diferença entre os grupos ( $p=0,856$ ). O tempo *post mortem* até a coleta dos hipocampus dos pacientes do grupo controle foram inferiores à 10hpm (Tabela 1). Dados das avaliações patológicas realizadas pelos médicos do SERPAT são apresentados resumidamente na Tabela 2.

**Tabela 1.** Dados da necrópsia do grupo controle

Grupo	Idade na Morte	Tempo <i>post-mortem</i>	Causa mortis (Imediata)
Ctrl	31	3h10m	Broncopneumonia bilateral
Ctrl	43	4h40m	Edema Pulmonar Agudo
Ctrl	50	6h40m	Causa indeterminada
Ctrl	21	9h	Insuficiência Cardíaca Crônica
Ctrl	24	6h30m	Estado Toxi-infeccioso
Ctrl	46	4h	Broncopneumonia Confluyente
Ctrl	42	3h30m	Choque Hipovolêmico
Ctrl	47	4h50m	Septicemia
Ctrl	49	3h35m	Choque Séptico
Ctrl	23	5h	Leucemia Linfóide Aguda
Ctrl	55	3h45m	Metástases Múltiplas (Adenocarcinoma gástrico)
Ctrl	45	6h	Cardiopatia Chagásica
Ctrl	35	4h45m	Desnutrição Grave
Ctrl	26	5h52m	Edema Agudo Pós-transplante Hepático
Ctrl	56	6h	Insuficiência Respiratória
Ctrl	23	5h	Pneumonia
Ctrl	60	6h	Febre, perda de peso, choque circulatório e cardiogênico
Ctrl	86	6h15m	Choque cardiogênico
Ctrl	39	5h25m	Hipertensão pulmonary
Ctrl	46	3h18m	Insuficiência respiratória

h: horas; m: minutos

Tabela 2. Laudos das biópsias cirúrgicas, emitidos pelo SERPAT

Grupo	Idade	Gliose	População Neuronal (perda celular)
VN	24	Sim	CA1 (G), <i>endfolium</i> (M), FD (P&D) demais setores (N)
VN	41	Sim	PS (G), CA1 (G), CA3 (M), CA4 (M), CA2 (N), FD (D)
VN	30	Sim	PS (G), CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), CA2 (M), FD (P&D)
VN	21	Sim	CA (G), PS (G), FD (P)
VN	28	Sim	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), CA2 (L), FD (P&D)
VN	41	Sim	CA3 (G), CA4 (G), CA2 (N), FD (G&D)
VN	44	Não	CA1 (D), FD (DL)
VN	35	Sim	CA1 (P), CA3 (P), CA4 (P), CA2 (M), FD (P&D)
VN	70	Não	CA1 (L).
VN	37	Sim	CA1 (G), CA4 (G), FD (PL&D), demais setores (A)
VN	40	Sim	CA1 (G), CA3 (M), CA2 (L), FD (P)
VN	45	Sim	CA1 (G), CA4 (M), CA3 (N), CA2 (N), FD (P)
VN	49	Sim	CA1 (G), CA3 (M), CA4 (M), CA2 (L), FD (P&D)
VN	20	Não	CA1 (G), CA3 (M), CA4 (M), CA2 (N), FD (D)
VN	19	Sim	CA1 (L), <i>endfolium</i> (M), CA2 (N), FD (D)
VN	39	Não	CA1 (P)
VN	43	Não	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), CA2 (M), FD (D)
VN	32	Não	CA1 (M), CA4 (M), CA2 (N)
VN	35	Não	CA1 (L)
VN	40	Não	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), CA2 (L)
VN	32	Sim	CA1 (M), CA3 (G), CA4 (G)
VN	24	Não	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), CA2 (N), FD (D)
VN	21	Sim	CA1 (G), CA4 (M), CA2 (L), FD (L&D), CA3 (A)
VN	33	Sim	CA1 (G), CA3 (L), CA4 (L), CA2 (N) FD (D)
AL	33	Sim	PS (G), CA1 (G), CA3 (M), CA4 (M), FD (P), CA2 (N)
AL	55	Sim	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), CA2 (M), FD (P&D)
AL	29	Sim	CA4 (G), hilo (G), FD (P), demais setores (A)
AL	39	Sim	CA1 (G), demais setores (L), FD (D)
AL	19	Sim	CA1 (G), CA3 (M), CA4 (M), CA2 (N), FD (P&D)
AL	39	Sim	CA1 (G), CA4 (G), CA2 (N), CA3 (A), FD (P&D)
AL	44	Sim	CA1 (G), CA4 (G), CA2 (M), FD (P&D), CA3 (A)
AL	29	Não	CA1 (G), CA4 (M) CA2 (N), FD (L&D)
AL	31	Sim	PS (G), CA1 (G), CA3 (M), CA4 (M), FD (P&D), CA2 (N)
AL	40	Sim	CA1 (M), CA2 (M), CA3 (M), CA4 (M), FD (P&D)
AL	33	Não	CA4 (G), FD (PG&D), demais setores (A)
AL	39	Sim	CA1 (G), camada polimorfa dos demais setores (G), FD (D)
AL	37	Sim	CA1 (G), CA3 (M), CA4 (M), CA2 (N), FD (D)
AL	43	Sim	CA (G), CA2 (P), FD (P&D)
AL	34	Sim	CA1 (G), CA4 (M), CA2 (N), CA3 (N), FD (L&D)
AL	45	Sim	CA1 (G), PS (G), CA3 (M), CA4 (M), CA2 (N), FD (P)
AL	37	Não	CA1 (P), polimórfica (P), demais regiões (N), FD (D)
AL	44	Não	FD (P), CA1 (P), CA3 (P), CA4 (P), CA2 (N)
AL	42	Sim	CA1 (G), CA4 (G), CA3 (M), CA2 (N), FD (D)
AL	36	Não	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (N), CA2 (G), FD (D)
AL	52	Não	CA1 (G), CA4 (G), CA2 (N), CA3 (N), FD (D)
AL	39	Sim	CA1 (G), demais regiões (N), FD (D)
AL	44	Não	CA1 (G), CA3 (M), CA4 (M), CA2 (N), FD (N)
AL	57	Não	CA1 (G), CA3 (G), CA2 (N), FD (D)
AG	50	Sim	CA1 (G), CA4 (M), FD (P&D), outros setores (N)
AG	43	Sim	PS (G), CA1 (G), CA4 (G), CA3 (M), CA2 (M), FD (G&D)

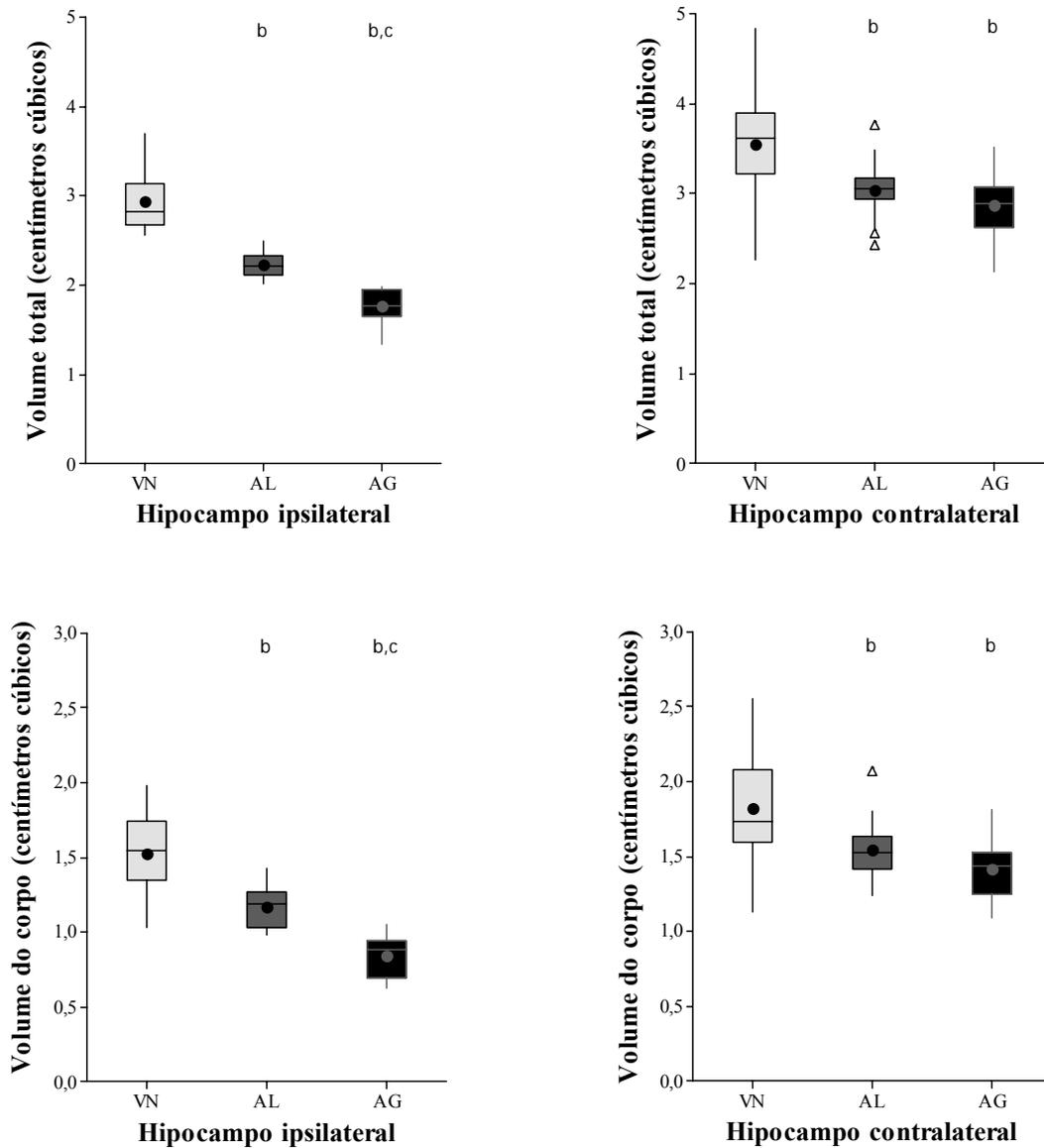
**Tabela 2 (Continuação).** Laudos das biópsias cirúrgicas, emitidos pelo SERPAT

<b>Grupo</b>	<b>Idade</b>	<b>Gliose</b>	<b>População Neuronal (perda celular)</b>
AG	39	Sim	CA1 (G), 4 (G) e FD. CA2 (A), CA3 (A)
AG	36	Sim	PS (G), CA1 (G), CA3 (M), CA4 (M), CA2 (L), FD (D)
AG	35	Sim	CA1 (L), CA3 (L), CA4 (L), CA2 (N), FD (D)
AG	37	-	-
AG	38	Sim	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), CA2 (M), FD (P&D)
AG	49	Sim	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), FD (G)
AG	34	Não	CA1 (G), CA3 (M), CA4 (M), CA2 (N), FD (D)
AG	32	-	-
AG	51	Sim	Todos os setores hipocampais (G), FD (P), CA2 (N)
AG	37	Sim	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), CA2 (L), FD (L)
AG	39	Sim	CA (G), FD (P&D)
AG	49	Sim	CA1 (G), CA3 (M), CA4 (L), CA2 (N), FD (D)
AG	21	Sim	CA1 (G), CA4 (A), CA3 (A), CA2 (A), FD (D)
AG	46	Sim	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), CA2 (N), FD (P)
AG	25	Sim	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), FD (P), CA2 (N)
AG	57	Não	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), CA2 (M), FD (P)
AG	39	-	-
AG	39	Não	CA1 (G), CA4 (M), CA2 (N), FD (P&D)
AG	44	Sim	CA1 (G), CA3 (M), CA4 (M), FD (D)
TD	45	Sim	CA1 (P), outros setores (A)
TD	38	Não	CA1 (L), FD (D)
TD	18	Não	Preservação de estruturas
TD	27	Não	CA1 (L)
TD	31	Não	CA1 (L)
TD	10	Sim	Hilo (M), FD (P&D), CA (A)
TD	23	Não	FD (P), CA1 (A), CA3 (A), CA2 (N), CA4 (N)
TD	34	Não	CA1 (L), CA3 (A)
TD	23	Não	CA1 (L)
TD	11	Não	CA1 (N), CA4 (N), FD (N), CA2 (A), CA3 (A)
TD	30	Não	CA1 (L)
TD	8	Não	CA1 (L)
TD	51	Sim	CA1 (L)
TD	39	Sim	Hipocampo (N)
TD	10	Sim	CA1 (L)
TD	34	-	-
TD	41	Sim	CA1 (G), CA3 (G), CA4 (G), CA2 (N), FD (P&D)
TD	21	-	-
TD	21	-	-
TD	41	Não	CA1 (L)

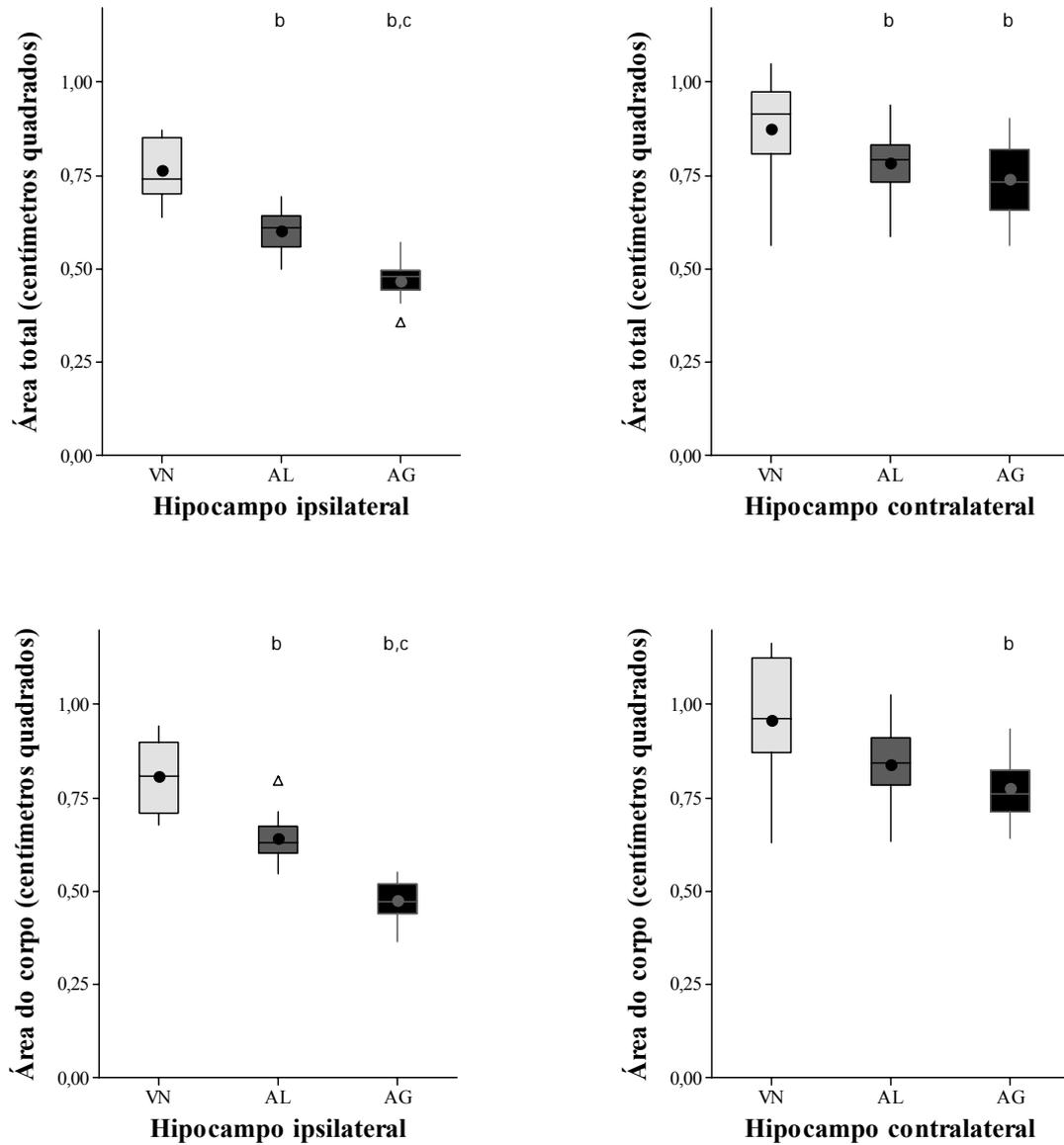
(L): perda neuronal leve; (M): perda neuronal moderada; (G): perda neuronal grave; (P): perda neuronal de gravidade não informada; (N): sem perda neuronal; (A): região ausente no tecido de biópsia; (D): dispersão neuronal; (P&D): perda neuronal sem graduação e dispersão neuronal; (L&D): perda neuronal leve e dispersão neuronal; (G&D): perda neuronal grave e dispersão neuronal.

#### **4.2. Volume e área hipocampal**

Através da volumetria hipocampal pela RNM os pacientes com ELTM foram divididos em três grupos, com o hipocampo ipsilateral ao foco das crises epiléticas ( $H_{\text{ipsi}}$ ) apresentando mediana de  $2,816 \text{ cm}^3$  no grupo VN,  $2,217 \text{ cm}^3$  no grupo AL e  $1,767 \text{ cm}^3$  no grupo AG. O hipocampo contralateral ao foco ( $H_{\text{contra}}$ ) foi de  $3,615 \text{ cm}^3$  no grupo VN,  $3,050 \text{ cm}^3$  no grupo AL e  $2,896 \text{ cm}^3$  no grupo AG. O volume do corpo do  $H_{\text{ipsi}}$  foi de  $1,544 \text{ cm}^3$  no grupo VN,  $1,191 \text{ cm}^3$  no grupo AL e  $0,877 \text{ cm}^3$  no grupo AG, enquanto o corpo do  $H_{\text{contra}}$  teve volume de  $1,737 \text{ cm}^3$  no grupo VN,  $1,520 \text{ cm}^3$  no grupo AL e  $1,440 \text{ cm}^3$  no grupo AG. A área coronal média do  $H_{\text{ipsi}}$ , medida na RNM, apresentou média de  $0,764 \pm 0,019 \text{ cm}^2$  no grupo VN,  $0,602 \pm 0,012 \text{ cm}^2$  no grupo AL e  $0,469 \pm 0,0150 \text{ cm}^2$  no grupo AG, enquanto a área coronal média do  $H_{\text{contra}}$  foi de  $0,877 \pm 0,033 \text{ cm}^2$  no grupo VN,  $0,785 \pm 0,018 \text{ cm}^2$  no grupo AL e  $0,739 \pm 0,028 \text{ cm}^2$  no grupo AG. O corpo do  $H_{\text{ipsi}}$  apresentou área coronal média de  $0,809 \text{ cm}^2$  no grupo VN,  $0,632 \text{ cm}^2$  no grupo AL e  $0,473 \text{ cm}^2$  no grupo AG. A área coronal média do corpo do  $H_{\text{contra}}$  foi de  $0,962 \text{ cm}^2$  no grupo VN,  $0,845 \text{ cm}^2$  no grupo AL e  $0,759 \text{ cm}^2$  no grupo AG. Houve diferença significativa entre os volumes total e do corpo e áreas total e do corpo nos  $H_{\text{ipsi}}$  em todos os grupos ( $p < 0,001$ ), com valores do grupo VN maiores que os grupos AL e AG e valores do grupo AL maiores que o do grupo AG. Os valores do  $H_{\text{contra}}$  do grupo VN foram maiores que os dos grupos AL e AG ( $p < 0,005$ ) exceto pela área coronal média do corpo, onde o grupo VN foi maior apenas do que o grupo AG ( $p = 0,001$ ). Houve ainda diferença significativa entre o índice de atrofia hipocampal ( $H_{\text{ipsi}}/H_{\text{contra}}$ ) do grupo AG e os dos grupos VN e AL ( $p < 0,001$ ), com valores de  $0,800$  no grupo VN,  $0,732$  no grupo AL e  $0,612$  no grupo AG. A área avaliada nas secções histológicas foi de  $0,587 \pm 0,042 \text{ cm}^2$  no grupo Ctrl,  $0,512 \pm 0,003 \text{ cm}^2$  no grupo VN,  $0,5 \pm 0,03 \text{ cm}^2$  no grupo AL,  $0,439 \pm 0,024 \text{ cm}^2$  no grupo AG e  $0,617 \pm 0,043 \text{ cm}^2$  no grupo TD, sendo que o grupo AG apresentou área da secção significativamente menor que a área dos grupos Ctrl e TD ( $p = 0,007$ ).



**Figura 3.** Volumetria total (gráficos superiores) e apenas do corpo (gráficos inferiores) do hipocampo ipsilateral (à esquerda) e contralateral ao foco das crises (à direita) em pacientes com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro) e atrofia hipocampal grave (AG, Box preto). Médias são indicadas pelos círculos e os *outliers* pelos triângulos. *b* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo VN; *c* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo AL.



**Figura 4.** Área coronal total (gráficos superiores) e apenas do corpo (gráficos inferiores) do hipocampo ipsilateral (à esquerda) e contralateral ao foco das crises (à direita) em pacientes com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro) e atrofia hipocampal grave (AG, Box preto). Médias são indicadas pelos círculos e os *outliers* pelos triângulos. *b* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo VN; *c* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo AL.

### **4.3. População Neuronal**

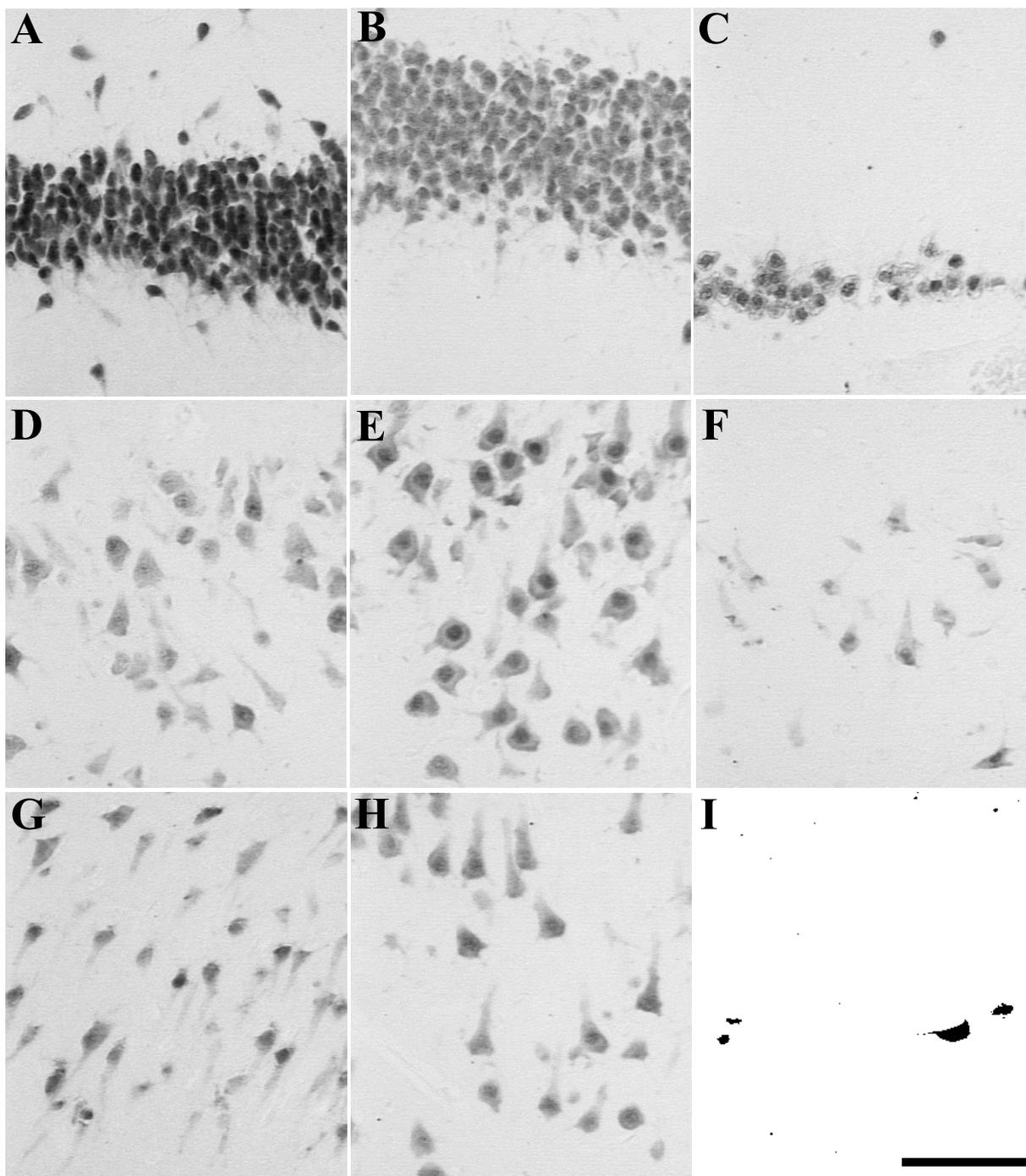
Na avaliação da imunohistoquímica para detecção de NeuN, observou-se distribuição deste antígeno no núcleo e no citoplasma do soma neuronal, não estendendo-se, entretanto, para os prolongamentos neuronais (axônios e dendritos) (Figura 5).

A análise da densidade neuronal, apresentada como milhares de células/mm<sup>3</sup>, revelou perda celular significativa em quase todas as regiões hipocâmpais nos grupos VN, AL e AG e em na região CA3 no grupo TD (Figuras 6-13). O subículo foi a única região preservada, em termos de densidade neuronal. Na camada granular, todos os grupos ELTM apresentaram menor densidade neuronal em relação aos grupos Ctrl e TD (Ctrl=375, VN=196, AL=188, AS=177, TD=312; mediana,  $p < 0,001$ ). Em CA4, todos os grupos ELTM apresentaram menor densidade de neurônios que o grupo Ctrl e os grupos VN e AG apresentaram menor densidade que o grupo TD (Ctrl=36±2, NV=12±2, AL=19±3, AG=10±2, TD=25±2; média±EPM,  $p < 0,001$ ). Em CA3, todos os grupos com epilepsia apresentaram menor densidade que o grupo Ctrl e os grupos VN e AG apresentaram menor densidade que o grupo TD (Ctrl=47±2, NV=18±2, AL=22±2, AG=17±3, TD=31±2;  $p < 0,001$ ). A região CA2 dos grupos ELTM apresentou menor densidade do que o grupo Ctrl (Ctrl=40, NV=30, AL=31, AG=26, TD=33;  $p < 0,001$ ). Em CA1, os grupos ELTM apresentaram menor densidade do que os grupos Ctrl e TD (Ctrl=42, NV=6, AL=1, AG=1, TD=37;  $p < 0,001$ ). No prosúbiculo, os grupos com atrofia na RNM apresentaram menor densidade do que os grupos Ctrl e TD (Ctrl=31, NV=22, AL=19, AG=13, TD=33;  $p < 0,001$ ). O subículo de todos os grupos com epilepsia teve densidade neuronal preservada (Ctrl=35±1, NV=31±1, AL=30±1, AG=31±2, TD=31±1;  $p = 0,246$ ).

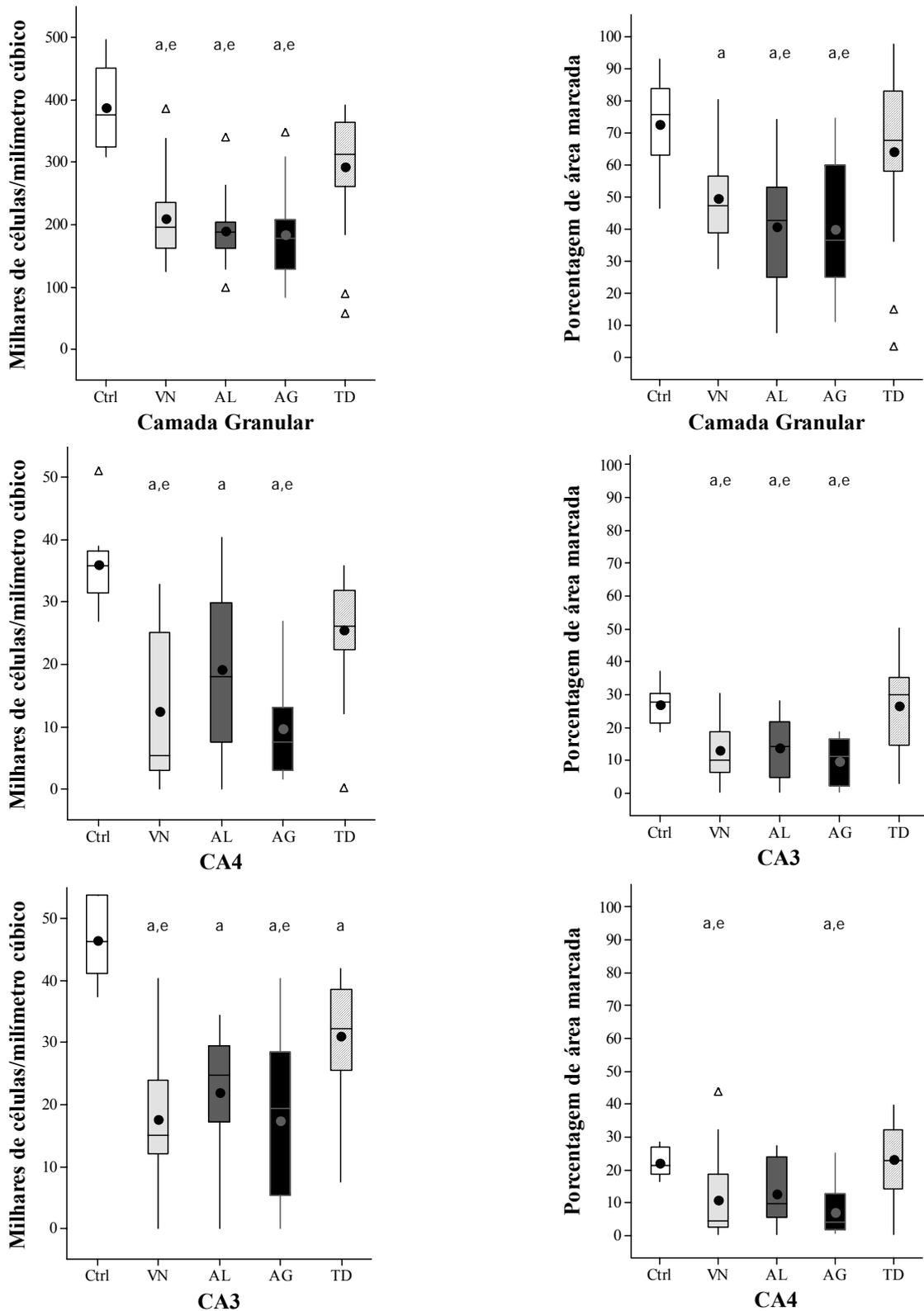
Todas as regiões avaliadas apresentaram alterações na área imunopositiva, principalmente redução da área expressando este antígeno. Na camada granular, todos os grupos ELTM apresentaram redução da área expressando NeuN em relação ao Ctrl e os grupos com atrofia na RNM apresentaram redução em relação ao grupo TD (Ctrl=1822±123, NV=1242±81, AL=1015±95, AG=1000±115, TD=1604±131;  $p < 0,001$ ). Em CA4 os grupos VN e AG apresentaram menor área marcada em relação aos grupos Ctrl e TD (Ctrl=534, NV=112, AL=237, AG=100, TD=573;  $p < 0,001$ ). Os grupos ELTM apresentaram menor área

marcada do que os grupos Ctrl e TD em CA3 (Ctrl=668±49, NV=319±54, AL=345±55, AG=239±46, TD=666±80;  $p<0,001$ ). Na região CA2, apenas o grupo AG apresentou menor área marcada por NeuN do que o grupo TD (Ctrl=654±33, NV=566±62, AL=552±56, AG=411±50, TD=706±68;  $p=0,017$ ). Em CA1 os grupos com atrofia na RNM apresentaram menor área marcada em relação à área dos grupos Ctrl e TD (Ctrl=474, NV=101, AL=32, AG=29, TD=615;  $p<0,001$ ). No prosúbiculo do grupo AG foi observada redução da área marcada em relação ao grupo TD (Ctrl=334, NV=296, AL=313, AG=205, TD=504;  $p=0,007$ ). No subículo, o grupo VN apresentou aumento da área marcada em relação ao grupo Ctrl (Ctrl=486, NV=639, AL=640, AG=542, TD=529;  $p=0,049$ ).

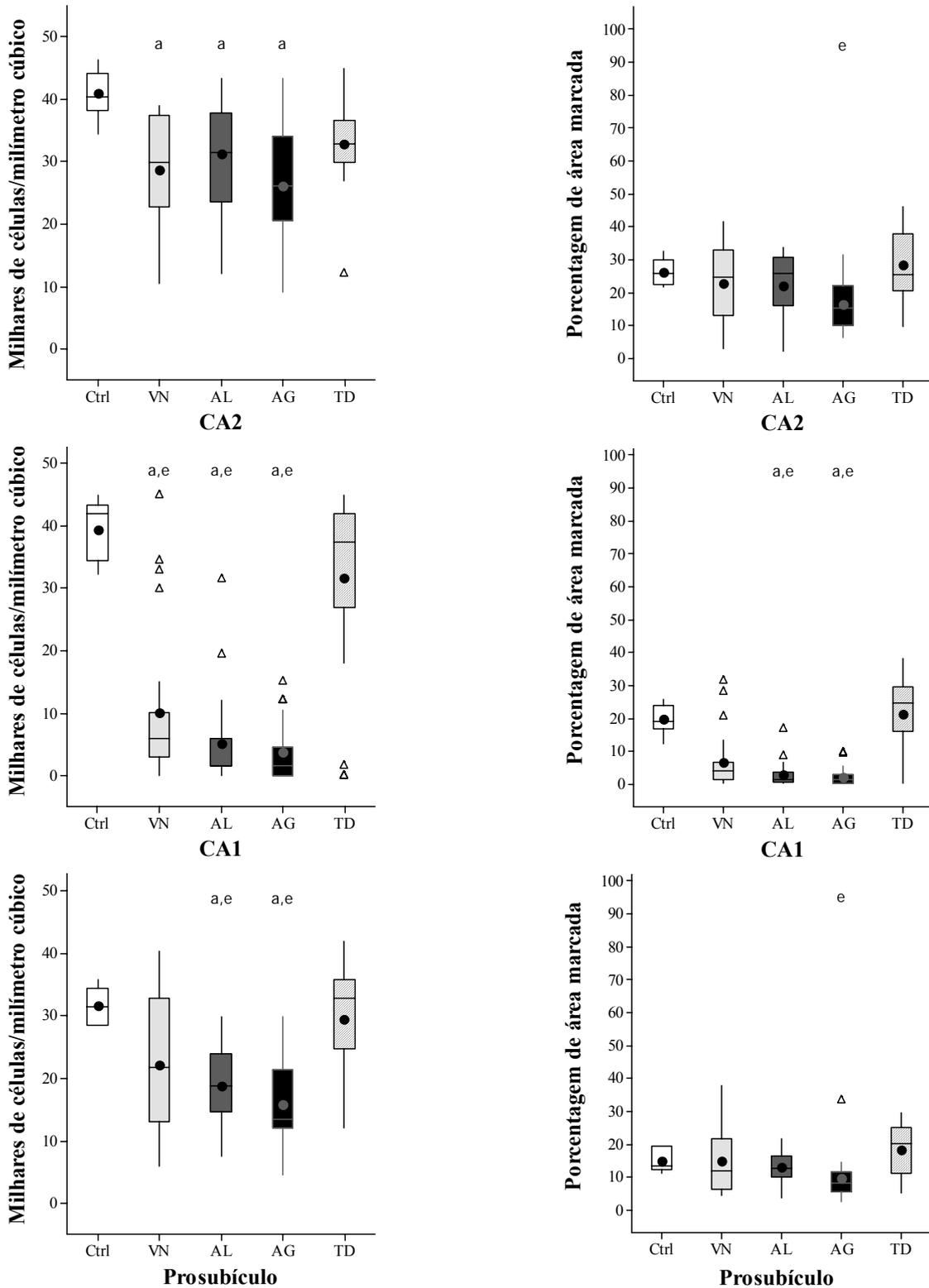
Em algumas das regiões avaliadas, os neurônios apresentaram alterações na área média (em  $\mu\text{m}^2$ ) de cada célula marcada por NeuN. Em CA3, os grupos com atrofia na RNM apresentaram menor área celular média do que o grupo TD (Ctrl=260±19, NV=313±26, AL=265±28, AG=246±23, TD=365±30;  $p=0,015$ ). No subículo dos grupos VN e AL houve aumento da área celular média em relação ao grupo Ctrl (Ctrl=253±20, NV=403±29, AL=401±21, AG=336±21, TD=354±27;  $p=0,004$ ). Não houve diferença nas áreas celulares médias entre os grupos na camada granular (Ctrl=121±10, NV=153±9, AL=132±10, AG=134±11, TD=134±7;  $p=0,263$ ), em CA4 (Ctrl=312, NV=350, AL=278, AG=290, TD=396;  $p=0,071$ ), CA2 (Ctrl=291, NV=338, AL=305, AG=284, TD=385;  $p=0,052$ ), CA1 (Ctrl=227, NV=297, AL=243, AG=233, TD=305;  $p=0,194$ ) e prosúbiculo (Ctrl=209, NV=295, AL=314, AG=260, TD=269;  $p=0,078$ ).



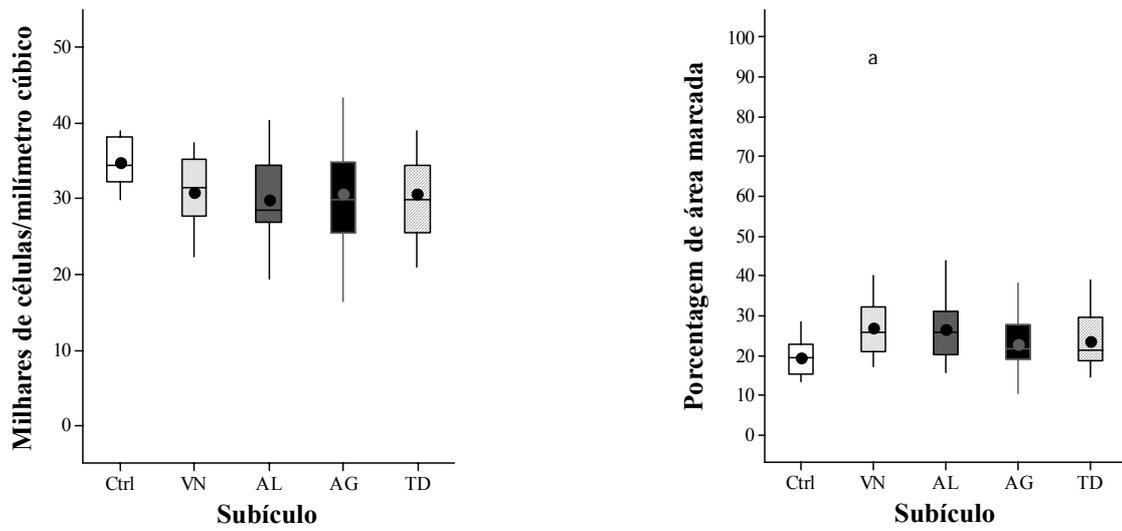
**Figura 5.** Imagens representativas da imunohistoquímica para NeuN na camada granular (A-C), CA2 (D-F) e CA1 (G-I) de pacientes dos grupos controle (A,D,G) e ELTM (B,C,E,F,H,I). Observar a marcação nuclear e citoplasmática nos neurônios, conforme descrito na literatura. Mesmo aparentando preservadas (B,E,H) todas as regiões nos grupos ELTM apresentaram perda neuronal. A camada CA2, apesar de descrita como preservada pela literatura, pode apresentar grave redução da densidade neuronal (F). A redução da densidade na camada granular, geralmente moderada, também pode ser grave (C). A barra em I indica 100 $\mu$ m.



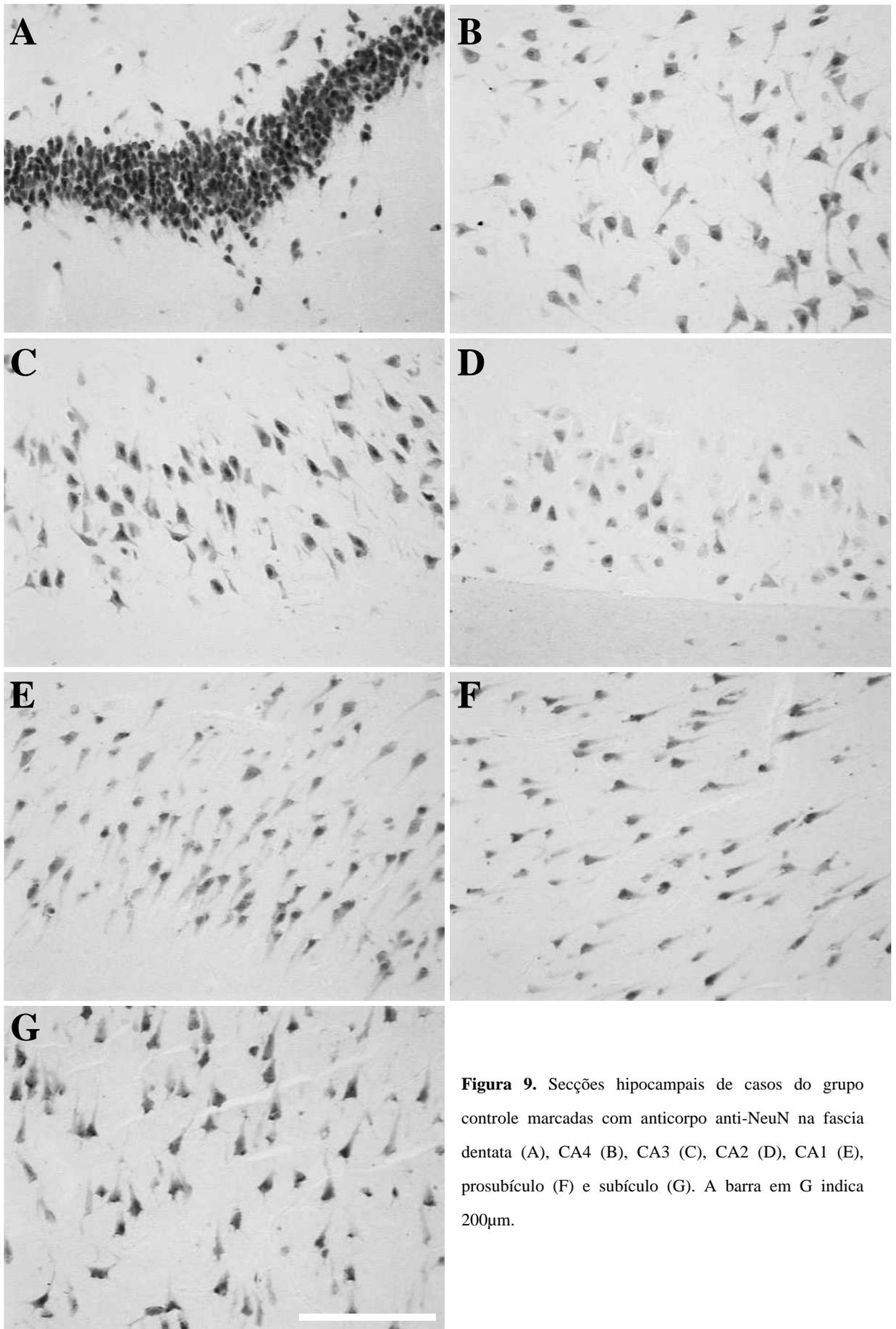
**Figura 6.** Densidades neuronais (à esquerda) e porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-NeuN (à direita) em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os *outliers* pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



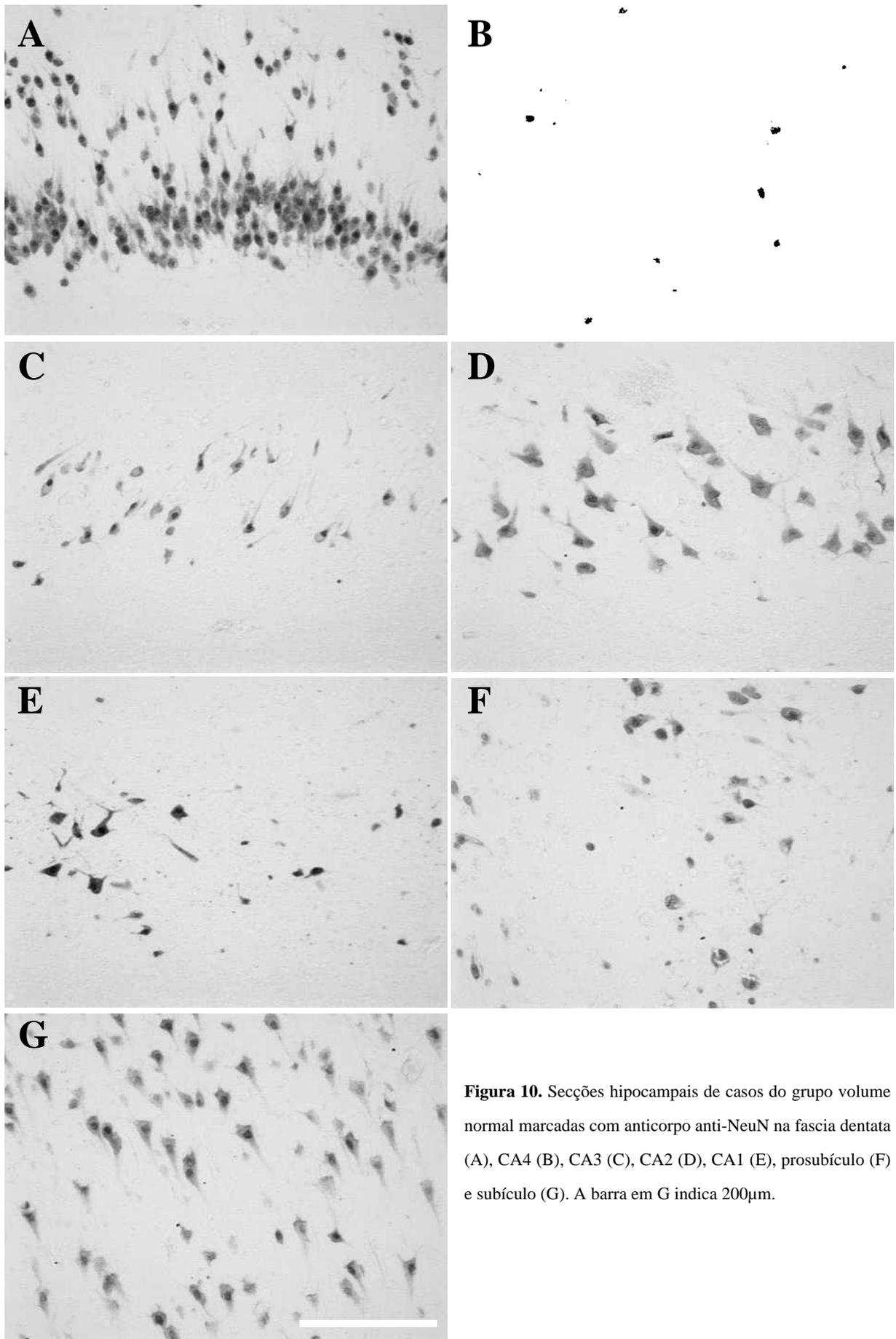
**Figura 7.** Densidades neuronais (à esquerda) e porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-NeuN (à direita) em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os *outliers* pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



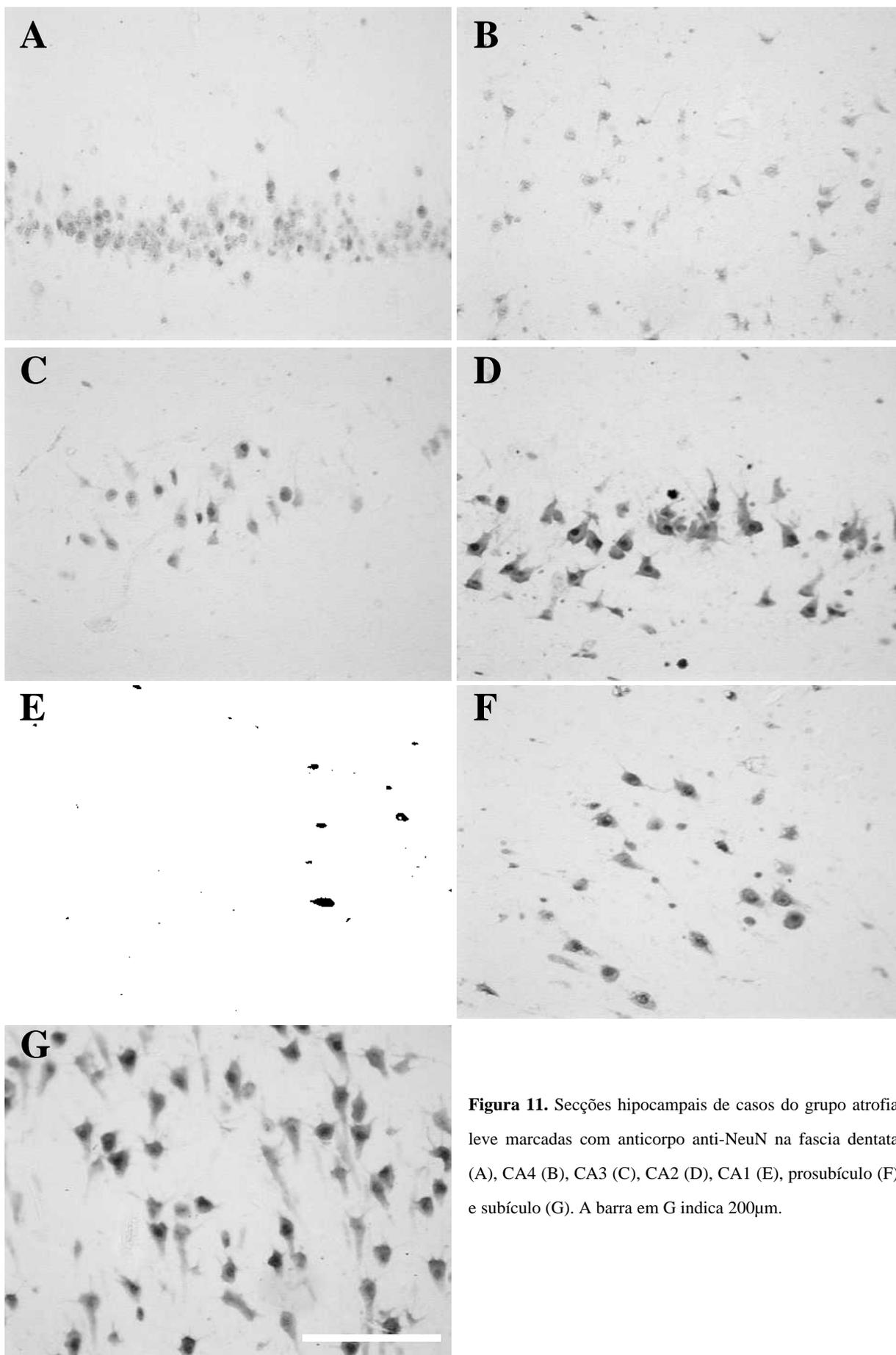
**Figura 8.** Densidades neuronais (à esquerda) e porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-NeuN (à direita) em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os *outliers* pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



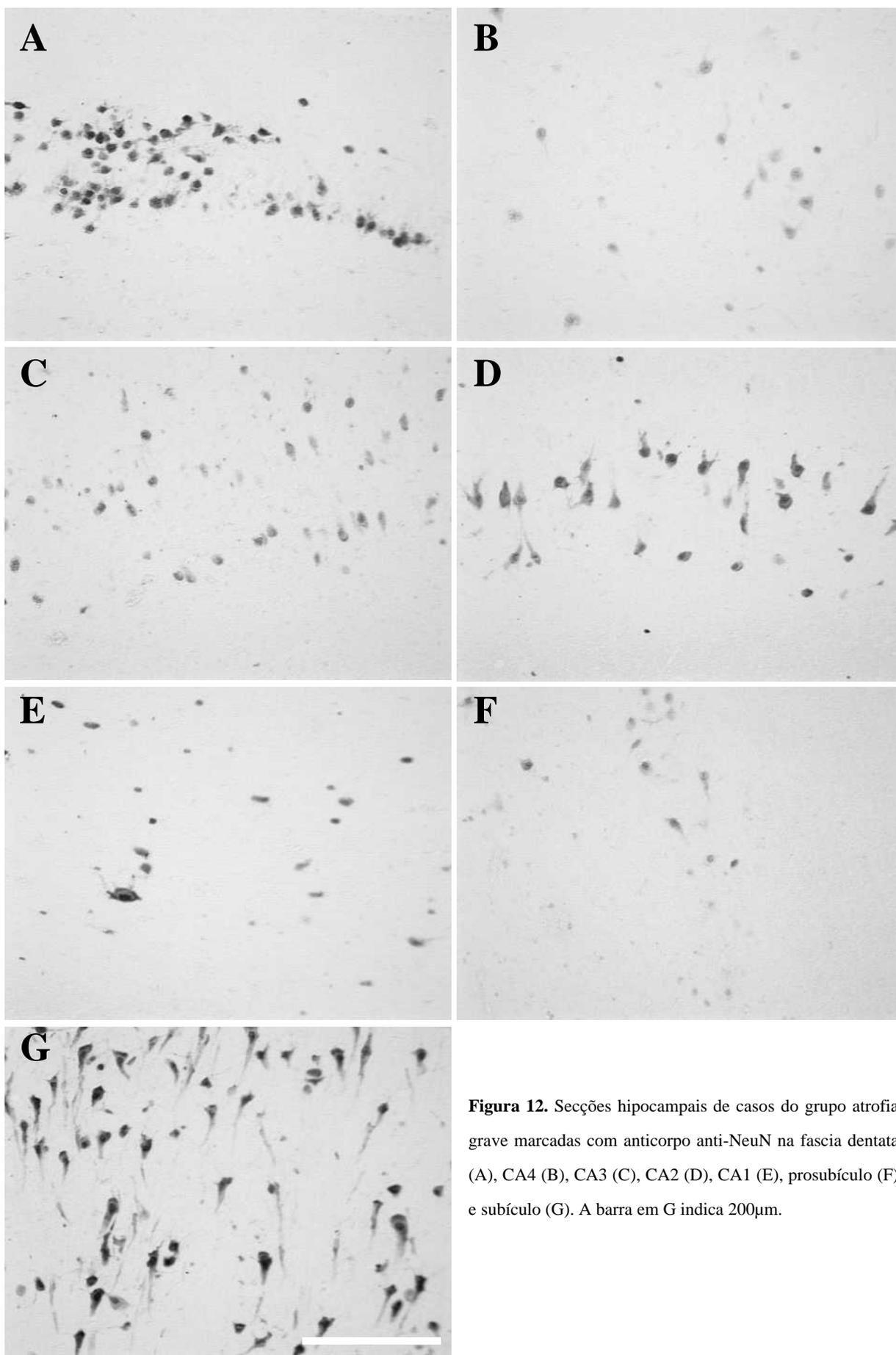
**Figura 9.** Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com anticorpo anti-NeuN na fascia dentata (A), CA4 (B), CA3 (C), CA2 (D), CA1 (E), prosúbicula (F) e subículo (G). A barra em G indica 200µm.



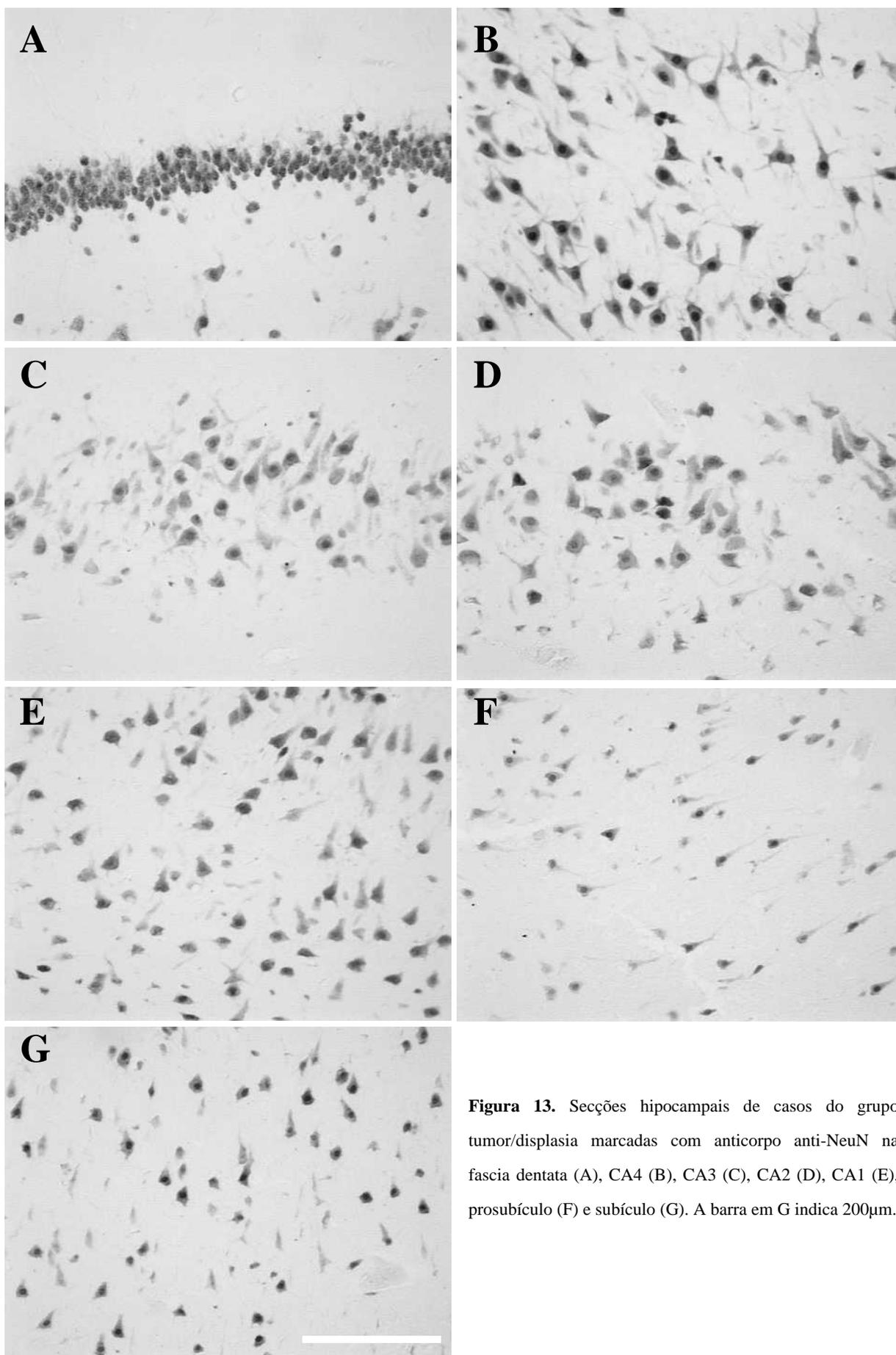
**Figura 10.** Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com anticorpo anti-NeuN na fascia dentata (A), CA4 (B), CA3 (C), CA2 (D), CA1 (E), prosúbicula (F) e subículo (G). A barra em G indica 200µm.



**Figura 11.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com anticorpo anti-NeuN na fascia dentata (A), CA4 (B), CA3 (C), CA2 (D), CA1 (E), prosúbiculo (F) e subículo (G). A barra em G indica 200µm.



**Figura 12.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com anticorpo anti-NeuN na fascia dentata (A), CA4 (B), CA3 (C), CA2 (D), CA1 (E), prosúbulo (F) e subúbulo (G). A barra em G indica 200µm.

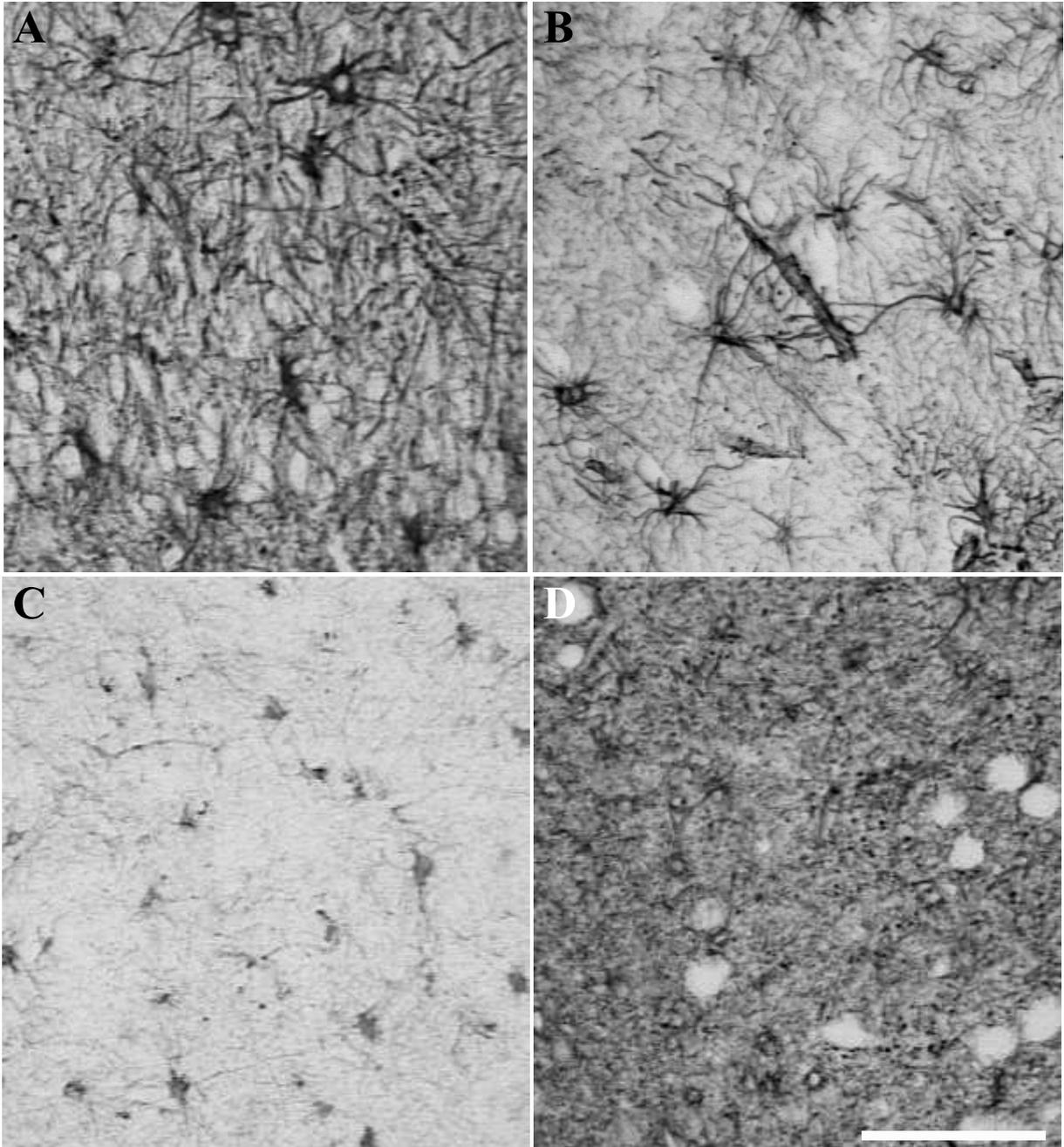


**Figura 13.** Secções hipocâmpais de casos do grupo tumor/dislusia marcadas com anticorpo anti-NeuN na fascia dentata (A), CA4 (B), CA3 (C), CA2 (D), CA1 (E), prosúbicúlo (F) e subúbicúlo (G). A barra em G indica 200 $\mu$ m.

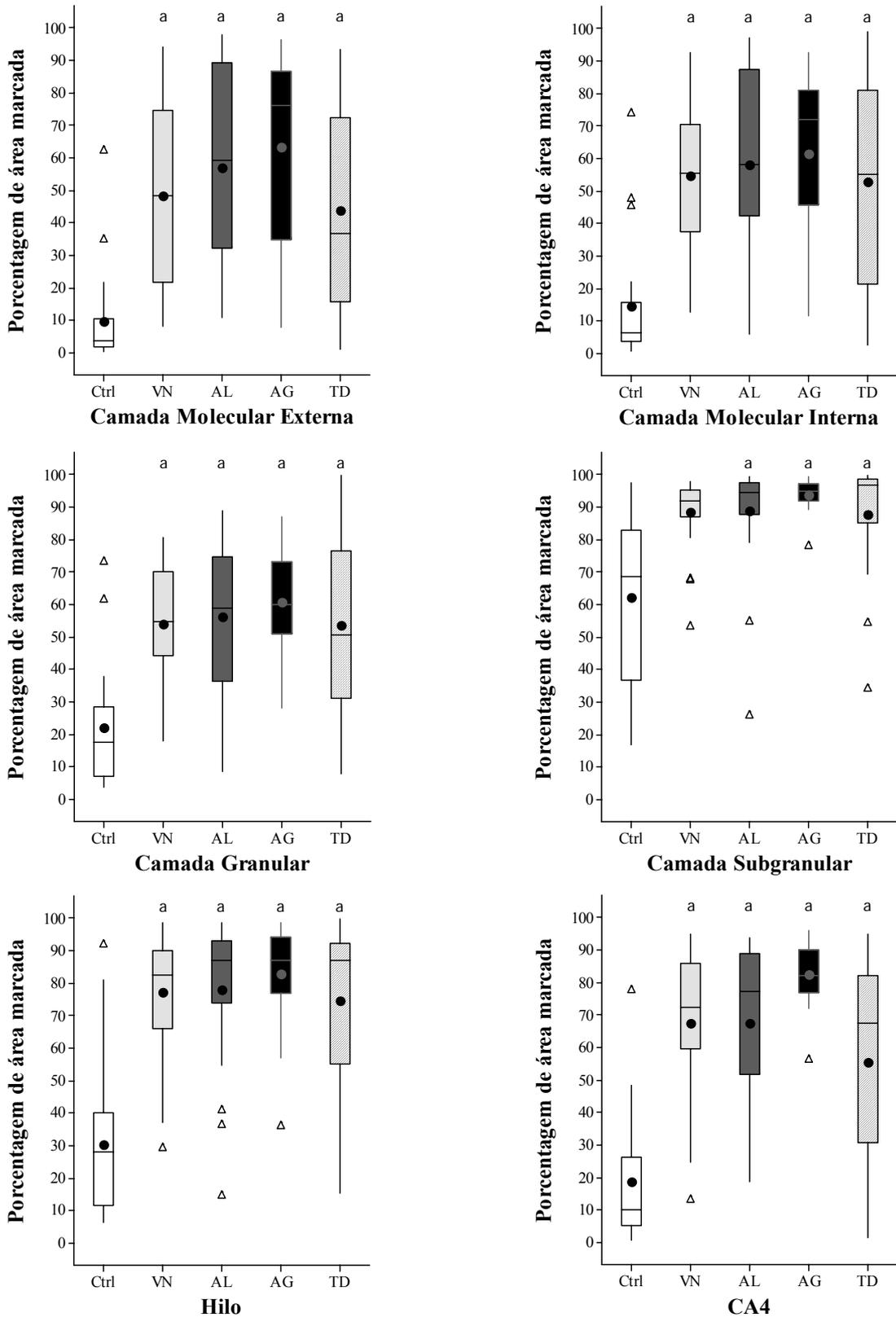
#### **4.4. Astrocitose**

O anticorpo anti-GFAP marcou principalmente células ricas em prolongamentos filiformes de disposição radial, em concordância com a morfologia de astrócitos (Figura 14). Como em muitos casos a expressão de GFAP foi muito intensa, e considerando-se que a espessura das secções é suficiente para permitir que corpos de astrócitos sobreponham-se, a avaliação da astrogliose foi realizada através da porcentagem de área marcada.

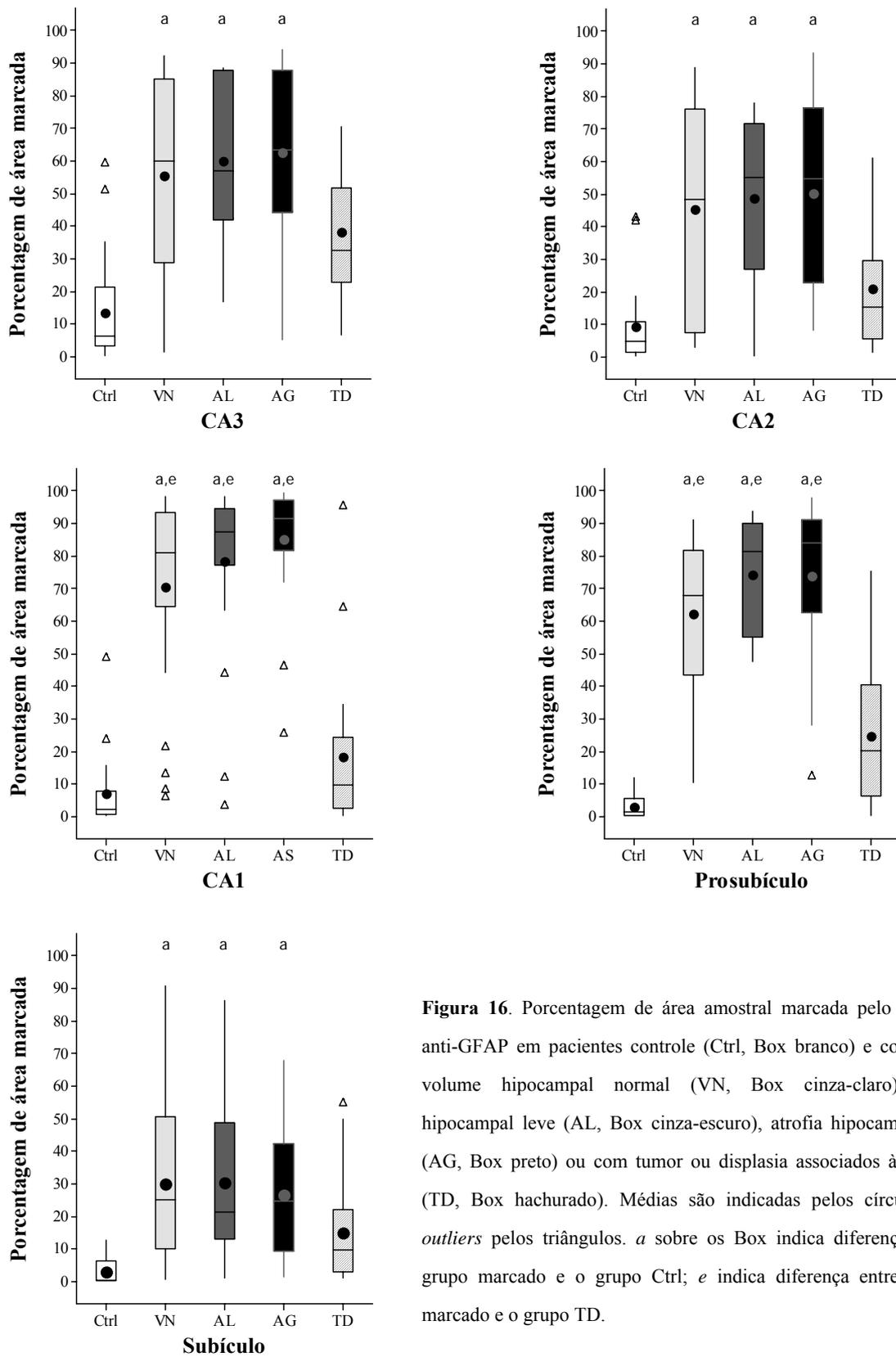
A expressão da proteína GFAP, marcadora de astrócitos reativos, apresentou-se aumentada, em relação ao grupo Ctrl, em todas as regiões dos grupos ELTM e na fascia dentata, hilo e CA4 do grupo TD (Figuras 15-21). Houve aumento da área marcada em todos os grupos ELT nas camadas molecular externa (Ctrl=93, VN=1207, AL=1481, AG=1899, TD=916;  $p<0,001$ ), molecular interna (Ctrl=152, VN=1384, AL=1451, AG=1802, TD=1382;  $p<0,001$ ), granular (Ctrl=546±104, VN=1352±82, AL=1404±119, AG=1517±82, TD=1336±137;  $p<0,001$ ), hilo (Ctrl=703, VN=2066, AL=2176, AG=2174, TD=2177;  $p<0,001$ ) e CA4 (Ctrl=249, VN=1805, AL=1935, AG=2053, TD=1683;  $p<0,001$ ). Os grupos ELTM apresentaram aumento significativo da expressão de GFAP, em relação ao Ctrl, em CA3 (Ctrl=154, VN=1501, AL=1425, AG=1587, TD=817;  $p<0,001$ ), CA2 (Ctrl=115, VN=1209, AL=1380, AG=1370, TD=377;  $p<0,001$ ) e subículo (Ctrl=4, VN=625, AL=526, AG=616, TD=237;  $p<0,001$ ) e em relação aos grupos Ctrl e TD em CA1 (Ctrl=52, VN=2026, AL=2183, AG=2291, TD=234;  $p<0,001$ ) e prosubículo (Ctrl=30, VN=1697, AL=2035, AG=2102, TD=499;  $p<0,001$ ). Os grupos com atrofia na RNM (AL e AG) e o grupo TD apresentaram maior área marcada em relação ao grupo Ctrl na camada subgranular (Ctrl=1719, VN=2298, AL=2369, AG=2376, TD=2417;  $p<0,001$ ).



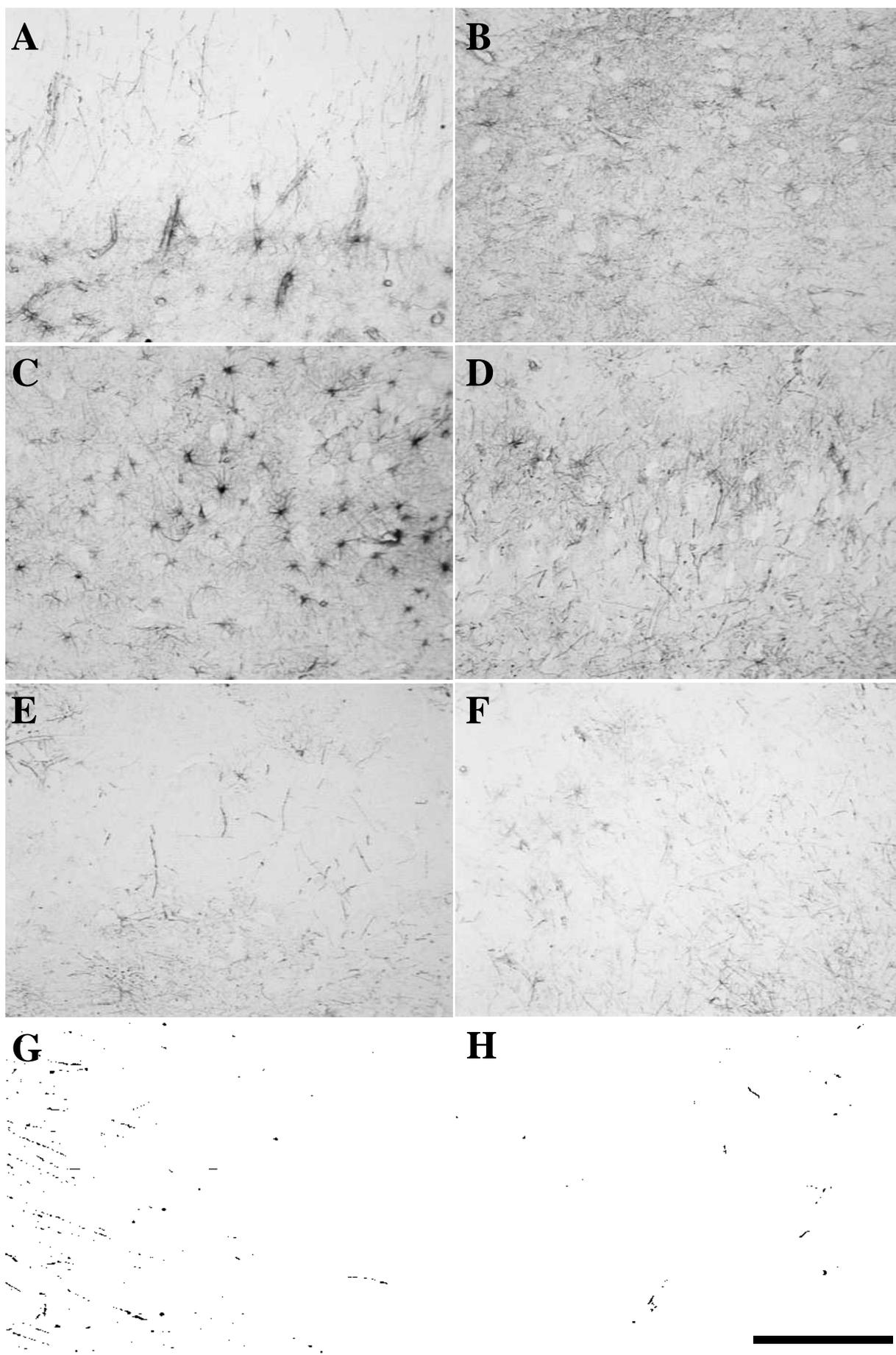
**Figura 14.** Imagens representativas da imunohistoquímica para GFAP em secções hipocâmpais de pacientes com ELT. Observar a variação do tamanho dos astrócitos (A,C). Ainda, a reação astrocítica pode ser tão alta que a quantidade de prolongamentos dificulta a individualização das células, principalmente quando a marcação do soma apresenta mesmo nível de cinza dos prolongamentos (D). Em B é possível observar partes de um vaso envolto pelos prolongamentos perivascularares dos astrócitos. As regiões das fotos são camada granular (A), subículo (B), hilo (C) e prosubículo (D). A barra em D indica 100µm.



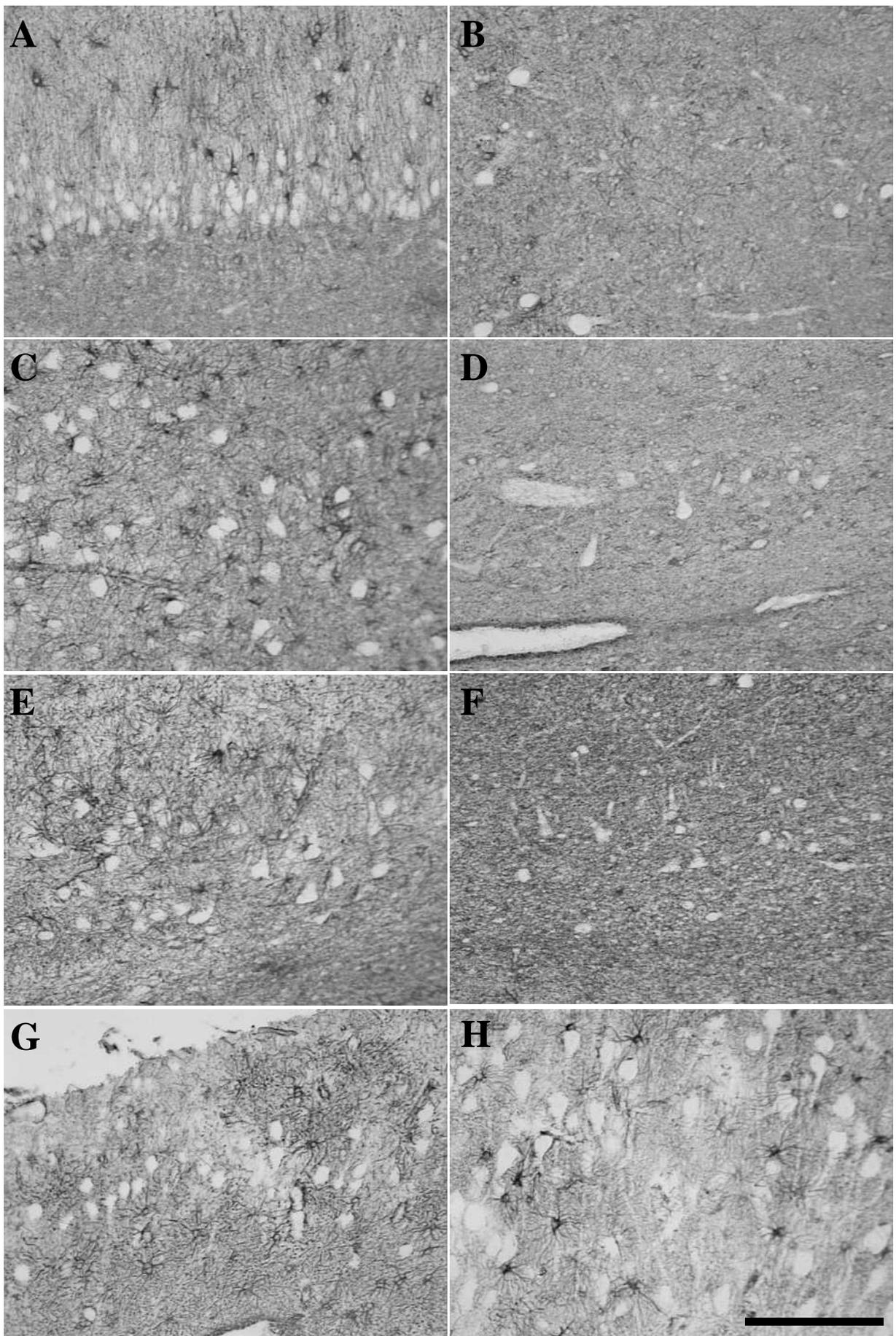
**Figura 15.** Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-GFAP em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os *outliers* pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



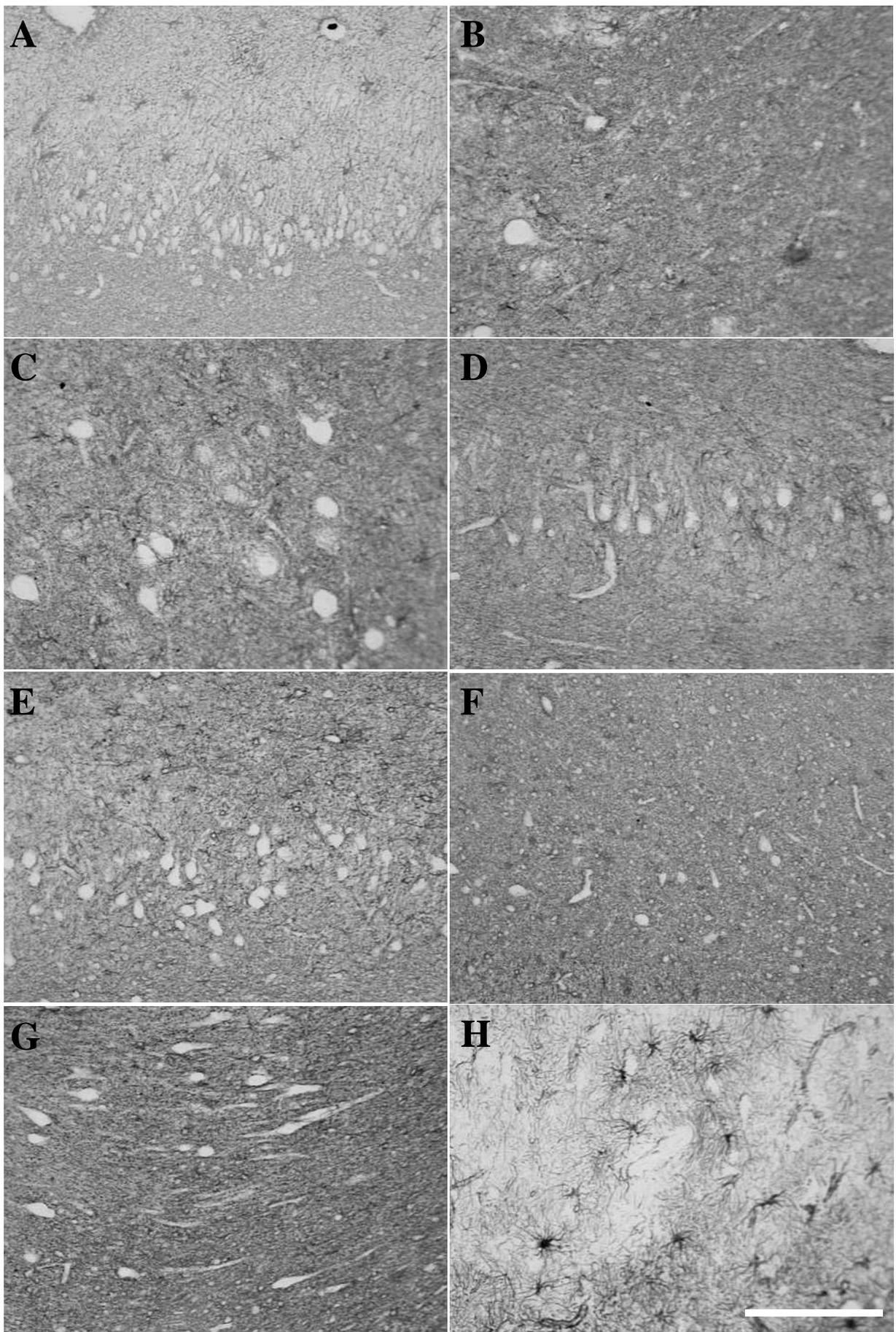
**Figura 16.** Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-GFAP em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os outliers pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



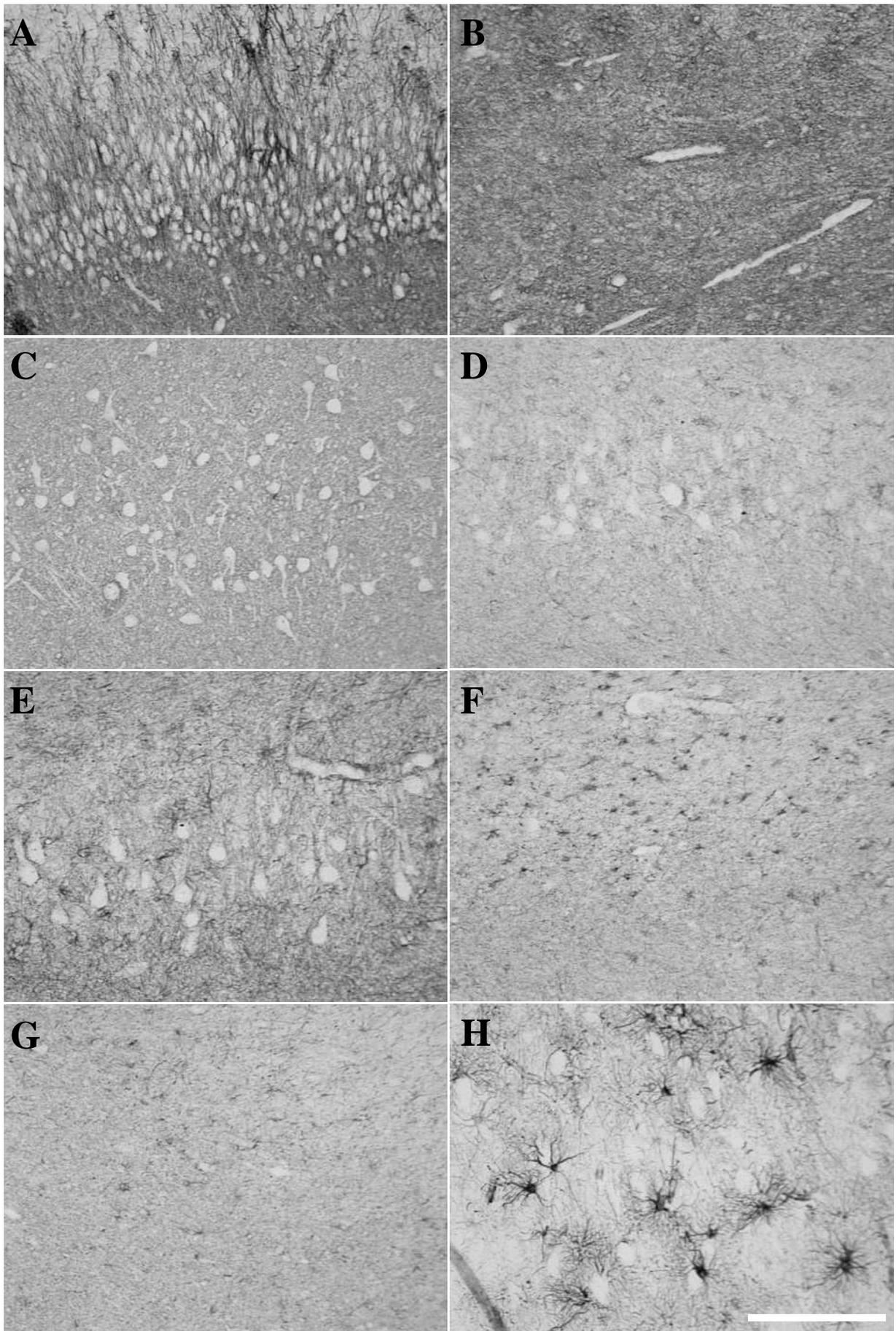
**Figura 17.** Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com anticorpo anti-GFAP na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbiculo (G) e subúbiculo (H). A barra em H indica 200µm.



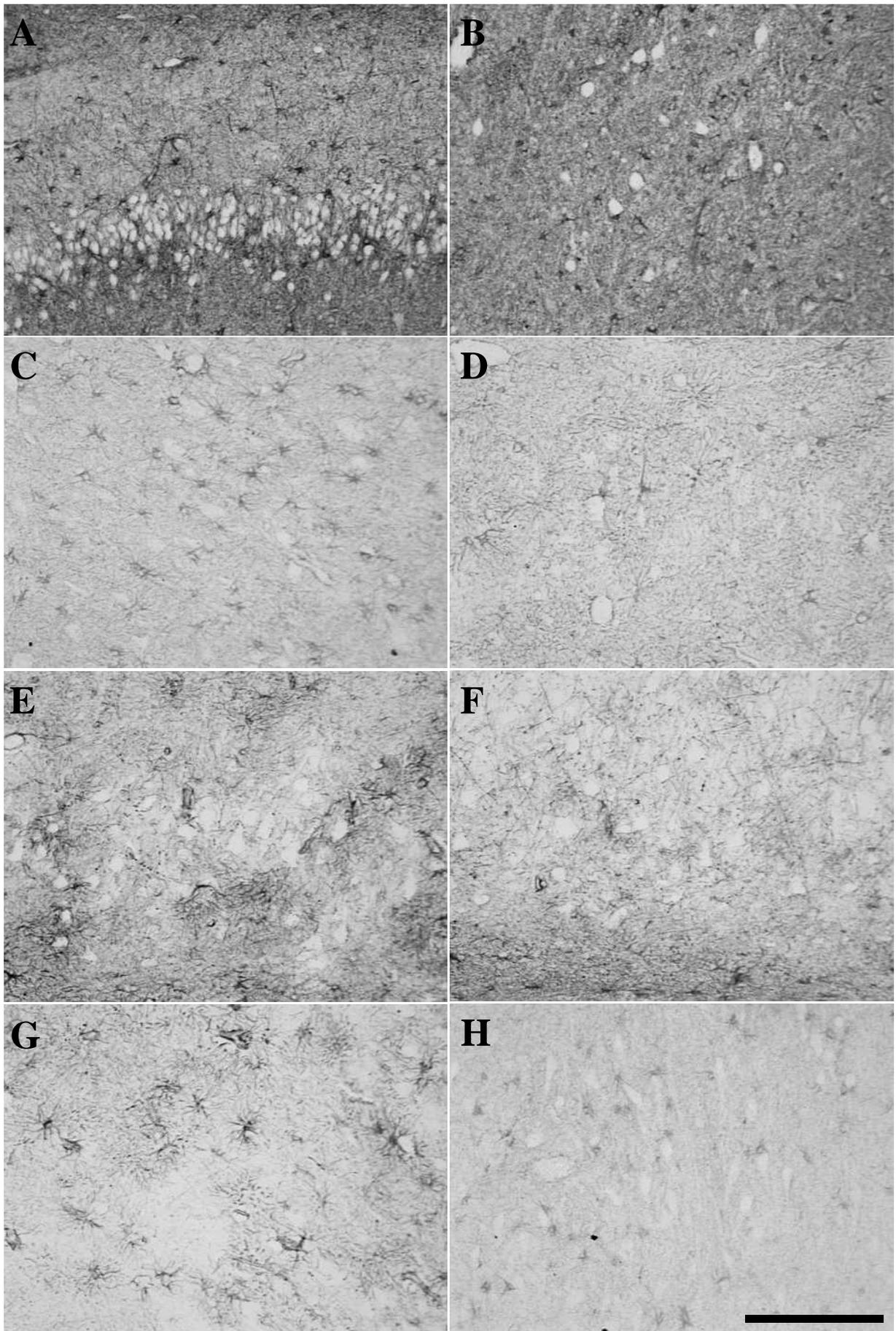
**Figura 18.** Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com anticorpo anti-GFAP na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbicúlo (G) e subúbicúlo (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 19.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com anticorpo anti-GFAP na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbulo (G) e subúbulo (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 20.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com anticorpo anti-GFAP na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbicula (G) e subúbicula (H). A barra em H indica 200µm.



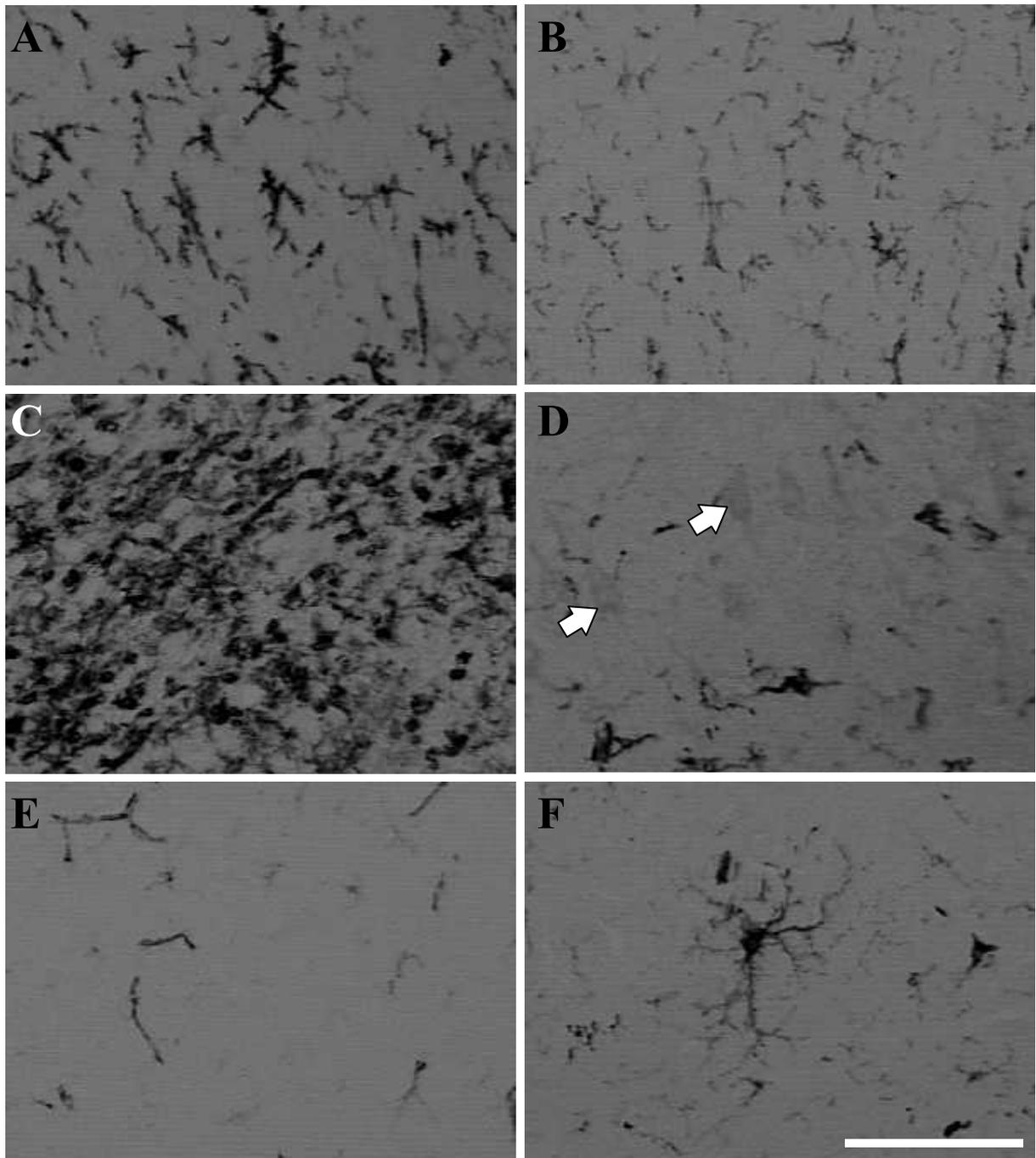
**Figura 21.** Secções hipocâmpais de casos do grupo tumor/displasia marcadas com anticorpo anti-GFAP na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbculo (G) e subúbculo (H). A barra em H indica 200 $\mu$ m.

#### **4.5. Microgliose**

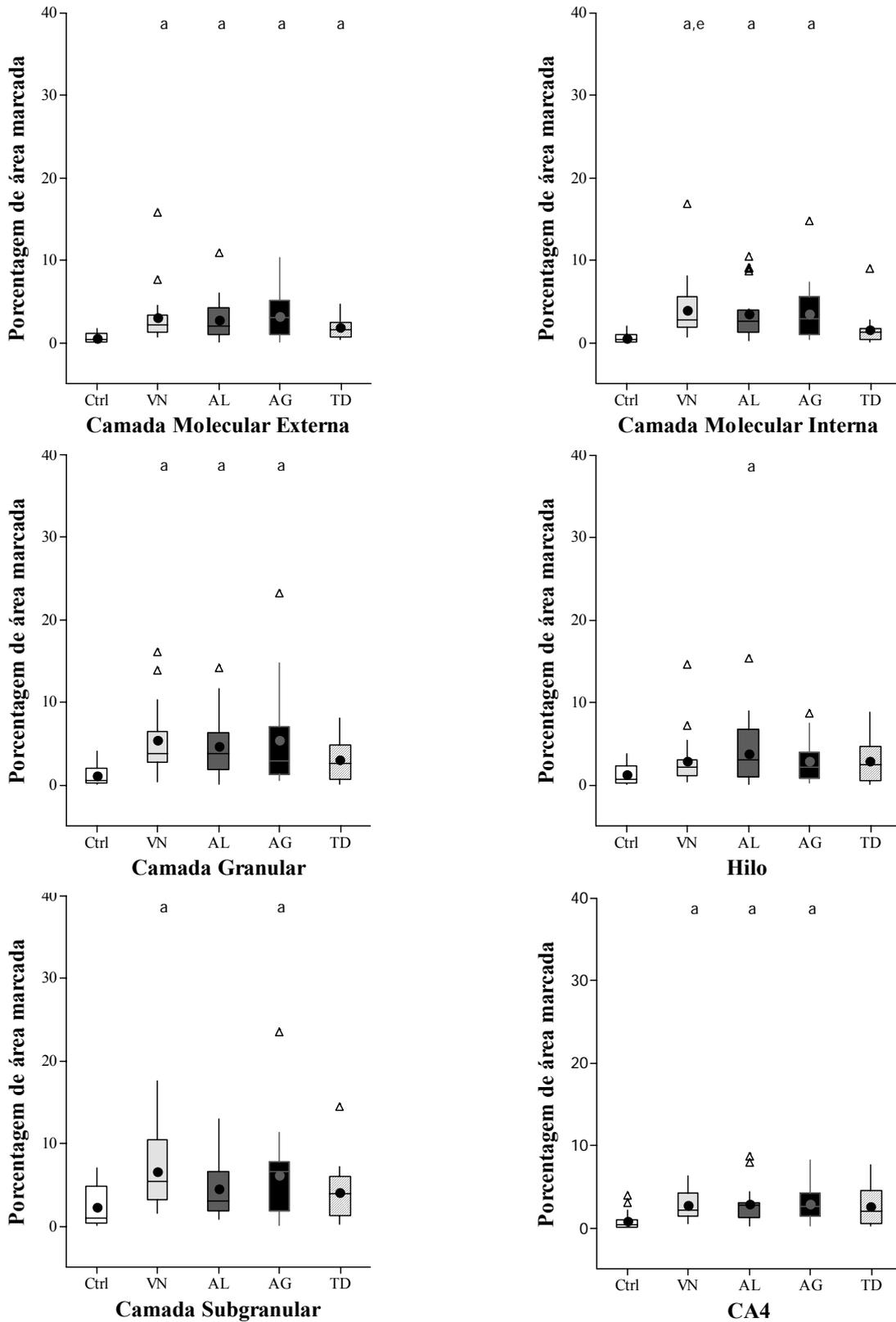
O anticorpo contra HLA-DR marcou principalmente células pequenas, com muitas ramificações irregulares e soma variando de evidente a pouco distinguível dos prolongamentos (Figura 22 A,B,F). Apenas em um caso foram observadas células arredondadas e sem prolongamentos (Figura 22 C). Em ambos os casos, estas células eram menores do que as marcadas pelo anticorpo anti-GFAP. Apesar de o anticorpo utilizado apresentar a ressalva de marcar também vasos (Figura 22 E), estes foram pouco marcados e, quando existentes, não foram incluídos na área amostral. Nos casos ELT foram também observados alguns neurônios marcados pelo anticorpo, porém com uma marcação muito tênue, que nunca foi captada pelo limiar (Figura 22 D). Além de micróglia, este anticorpo também marca macrófagos. Nas avaliações, não foi possível separar por morfologia macrófagos de micróglia. Por convenção, entretanto, chamaremos as células marcadas pelo anticorpo de micróglia.

A área imunopositiva para a proteína HLA-DR, marcadora de micróglia reativas, apresentou-se aumentada, em relação ao grupo Ctrl, em todas as regiões dos grupos ELTM e na camada molecular externa do grupo TD (Figuras 25-29). Houve aumento da área marcada ( $\mu\text{m}^2$ ) em todos os grupos ELT na camada molecular externa (Ctrl=7, VN=51, AL=53, AG=75, TD=39;  $p<0,001$ ). Na camada molecular interna os grupos ELTM apresentaram maior área que o Ctrl e o grupo VN apresentou maior área positiva do que o grupo TD (Ctrl=10, VN=69, AL=60, AG=71, TD=28;  $p<0,001$ ). Todos os grupos ELTM apresentaram maior área do que o grupo Ctrl na camada granular (Ctrl=14, VN=97, AL=96, AG=70, TD=63;  $p<0,001$ ), CA4 (Ctrl=8, VN=55, AL=68, AG=61, TD=39;  $p<0,001$ ), CA3 (Ctrl=12, VN=103, AL=88, AG=107, TD=35;  $p<0,001$ ), CA2 (Ctrl=10, VN=97, AL=52, AG=82, TD=30;  $p<0,001$ ) e prosúbulo (Ctrl=3, VN=42, AL=45, AG=45, TD=20;  $p<0,001$ ). Na camada subgranular apenas os grupos VN e AG apresentaram diferença em relação ao Ctrl (Ctrl=25, VN=134, AL=77, AG=150, TD=96;  $p=0,002$ ). No hilo o grupo AL apresentou aumento comparado com o grupo Ctrl (Ctrl=18, VN=55, AL=76, AG=57, TD=61;  $p=0,042$ ). Em CA1 todos os grupos ELTM apresentaram aumento em relação ao Ctrl e o grupo AG apresentou aumento em relação ao grupo TD (Ctrl=11, VN=63, AL=48, AG=81, TD=21;

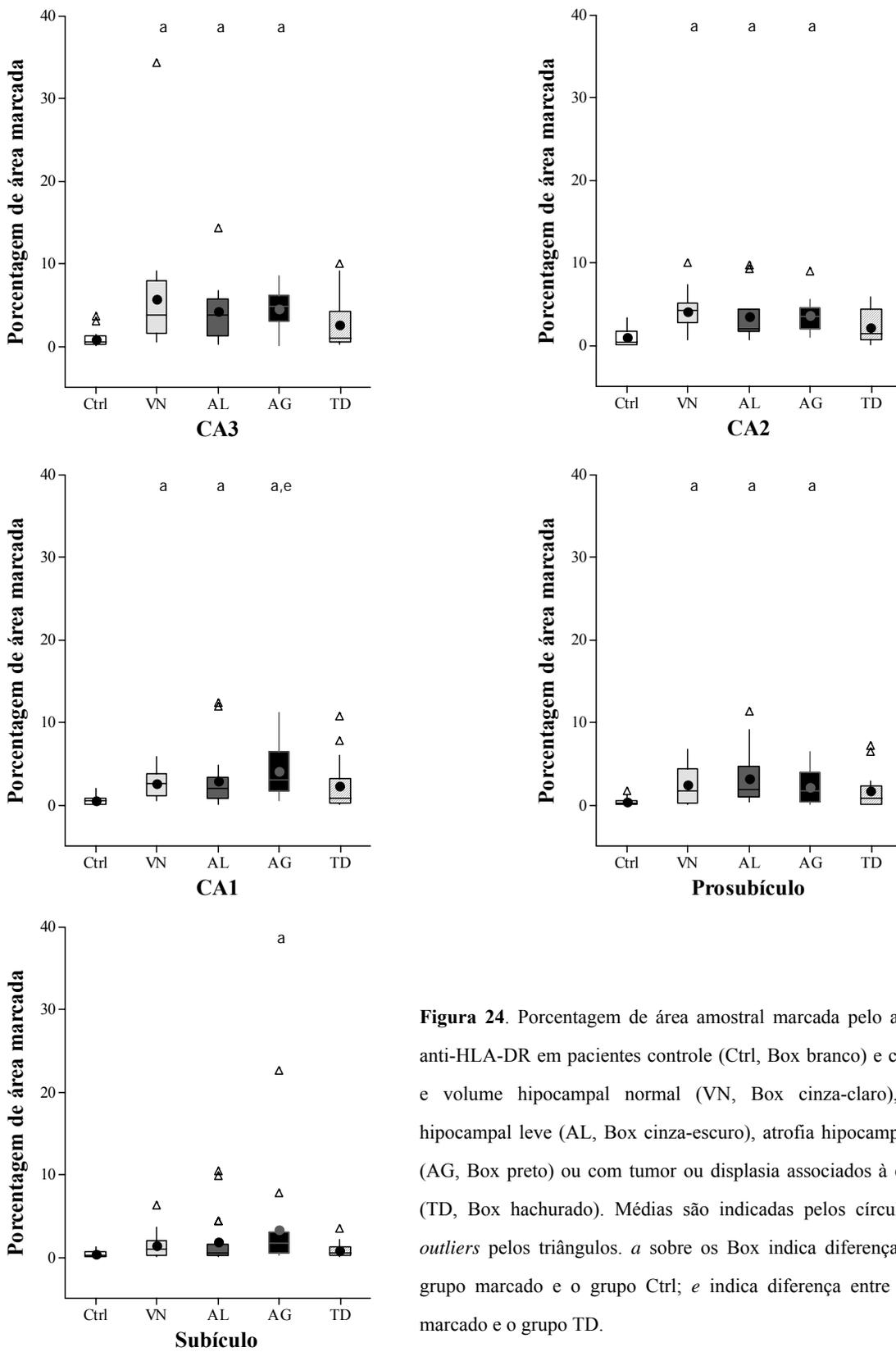
$p < 0,001$ ). No subículo apenas o grupo AG apresentou aumento em relação ao Ctrl (Ctrl=8, VN=24, AL=15, AG=39, TD=15;  $p=0,004$ ).



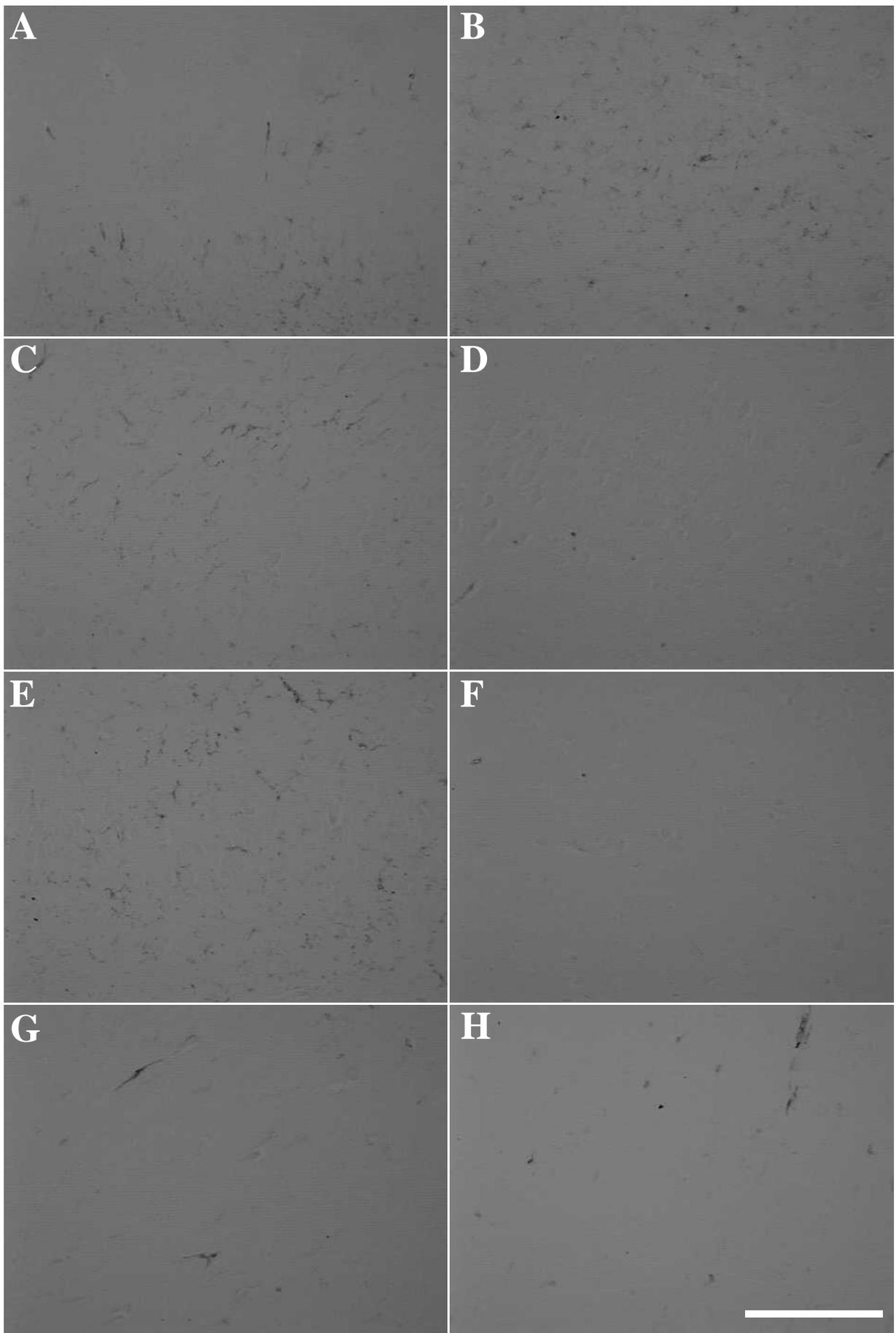
**Figura 22.** Imagens representativas da imunohistoquímica para HLA-DR em secções hipocâmpais de pacientes com ELT (A-E) e do grupo Ctrl (F). Com exceção da região CA3 de um caso (C), onde as células marcadas apresentaram soma arredondado e não possuíam prolongamentos, todas as micróglias marcadas pelo anticorpo apresentaram soma mais afilado, muitas vezes da mesma espessura dos prolongamentos. Em D notam-se células com morfologia neuronal marcadas fracamente pelo anticorpo anti-HLA-DR (alguns indicados por setas). Em E notar que este anticorpo por vezes marca vasos. As micróglias raramente apresentam delimitação clara, como visto em F, sendo difícil definir os limites de cada célula. Nas imagens temos as regiões granular (A,D), CA4 (C) e CA3 (B). A barra em F indica 100µm.



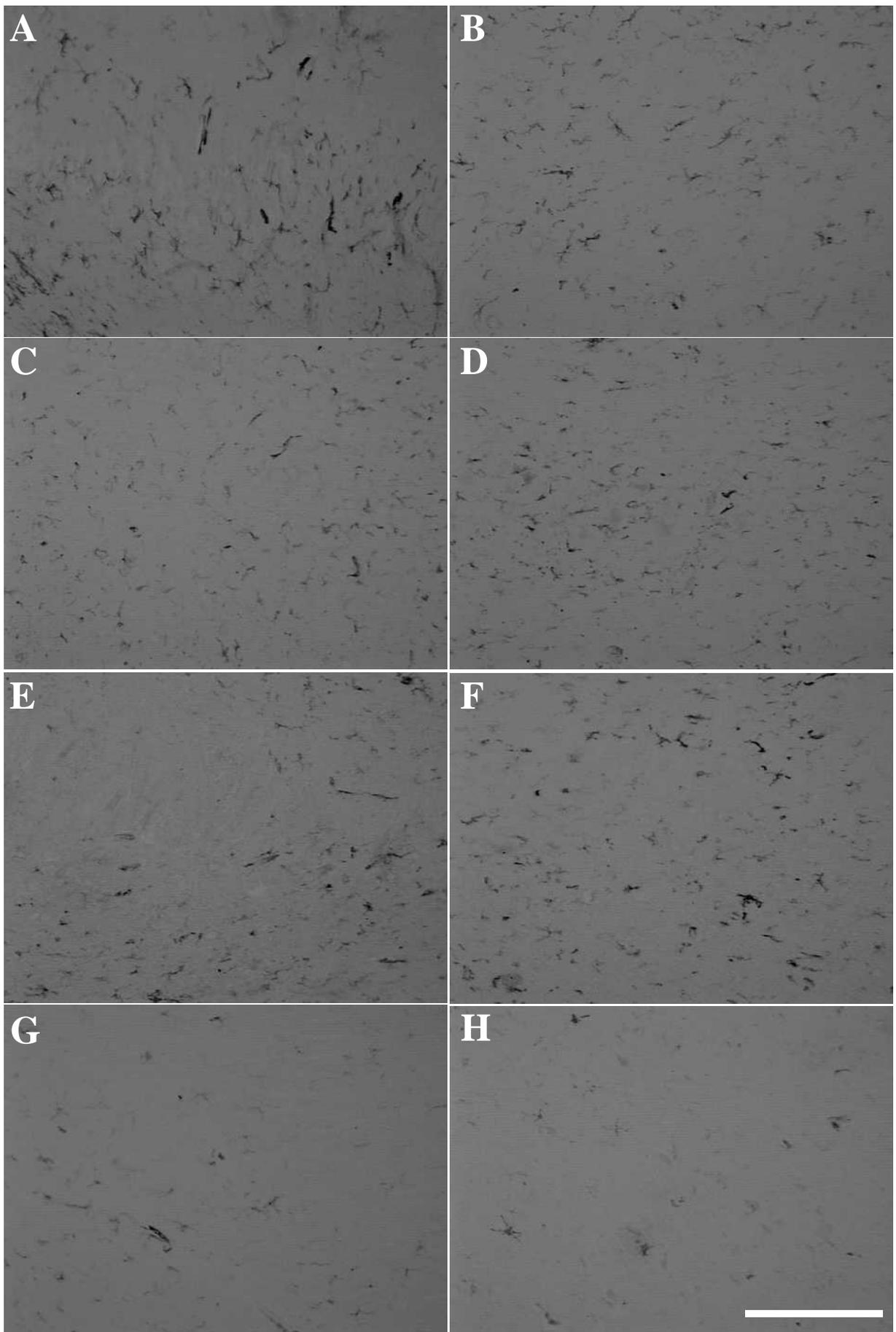
**Figura 23.** Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-HLA-DR em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os *outliers* pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



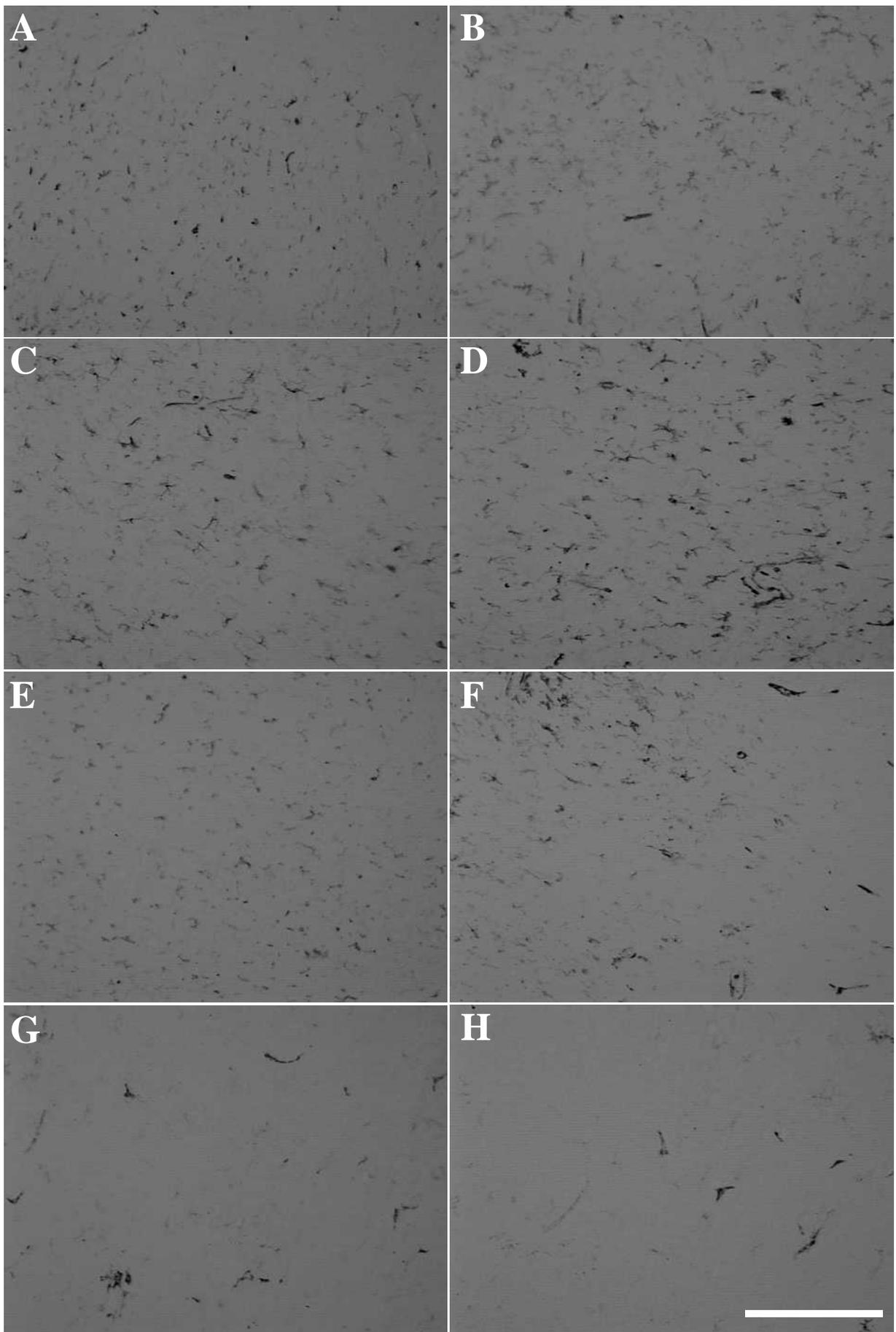
**Figura 24.** Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-HLA-DR em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os outliers pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



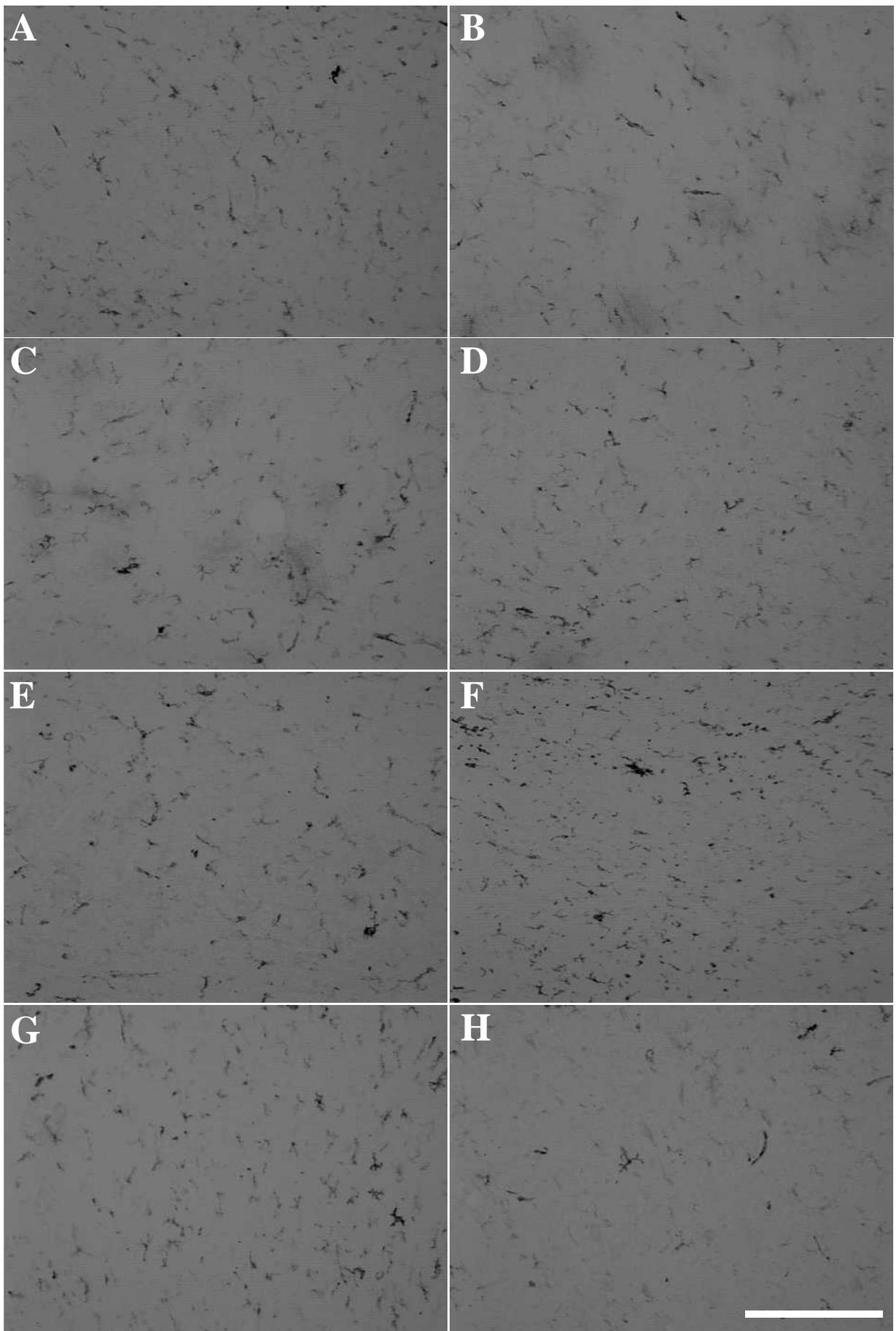
**Figura 25.** Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com anticorpo anti-HLA-DR na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbicúlo (G) e subúbicúlo (H). A barra em H indica 200µm.



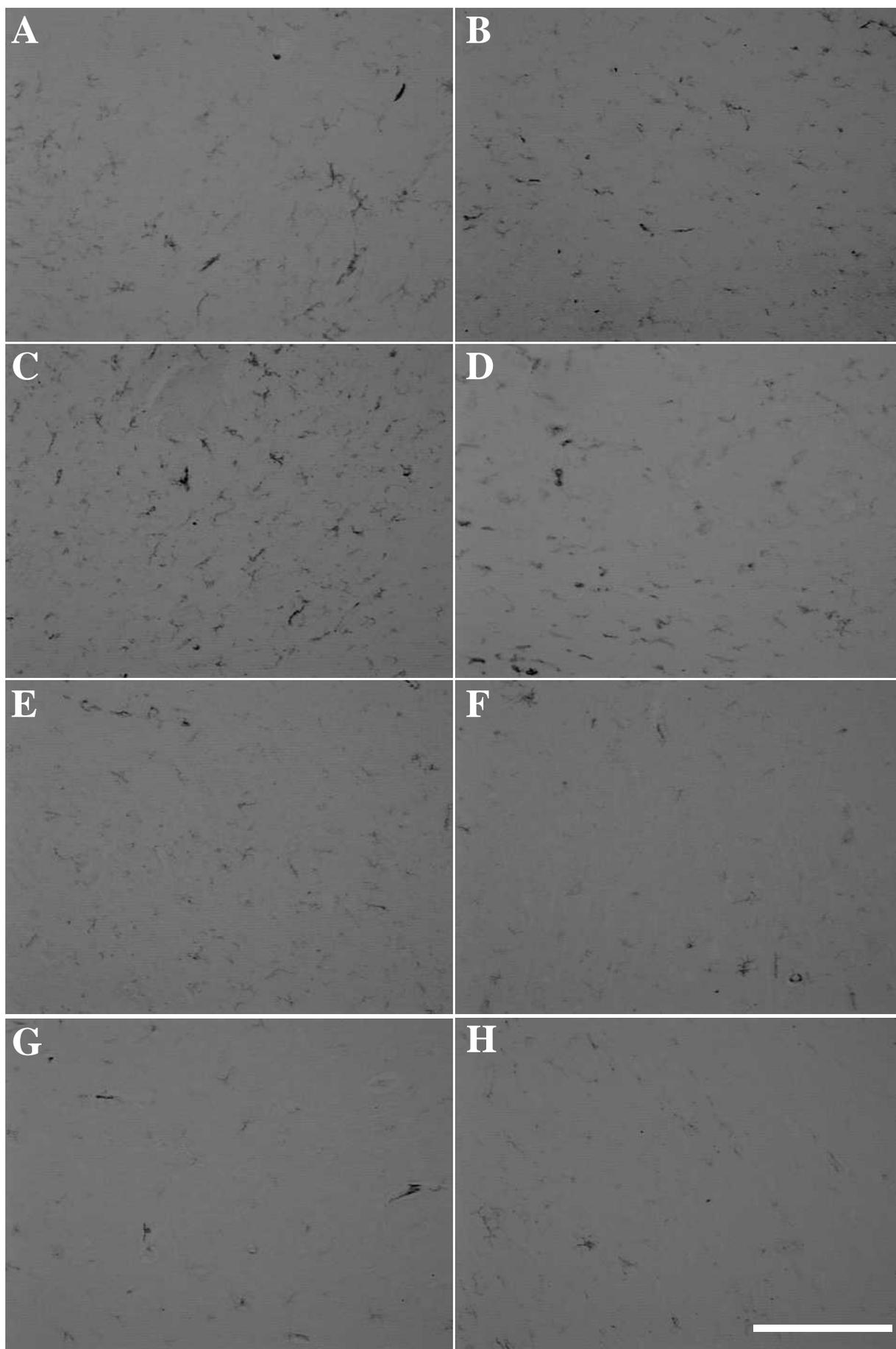
**Figura 26.** Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com anticorpo anti-HLA-DR na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbculo (G) e subúbculo (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 27.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com anticorpo anti-HLA-DR na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbulo (G) e subúbulo (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 28.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com anticorpo anti-HLA-DR na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbculo (G) e subúbculo (H). A barra em H indica 200µm.



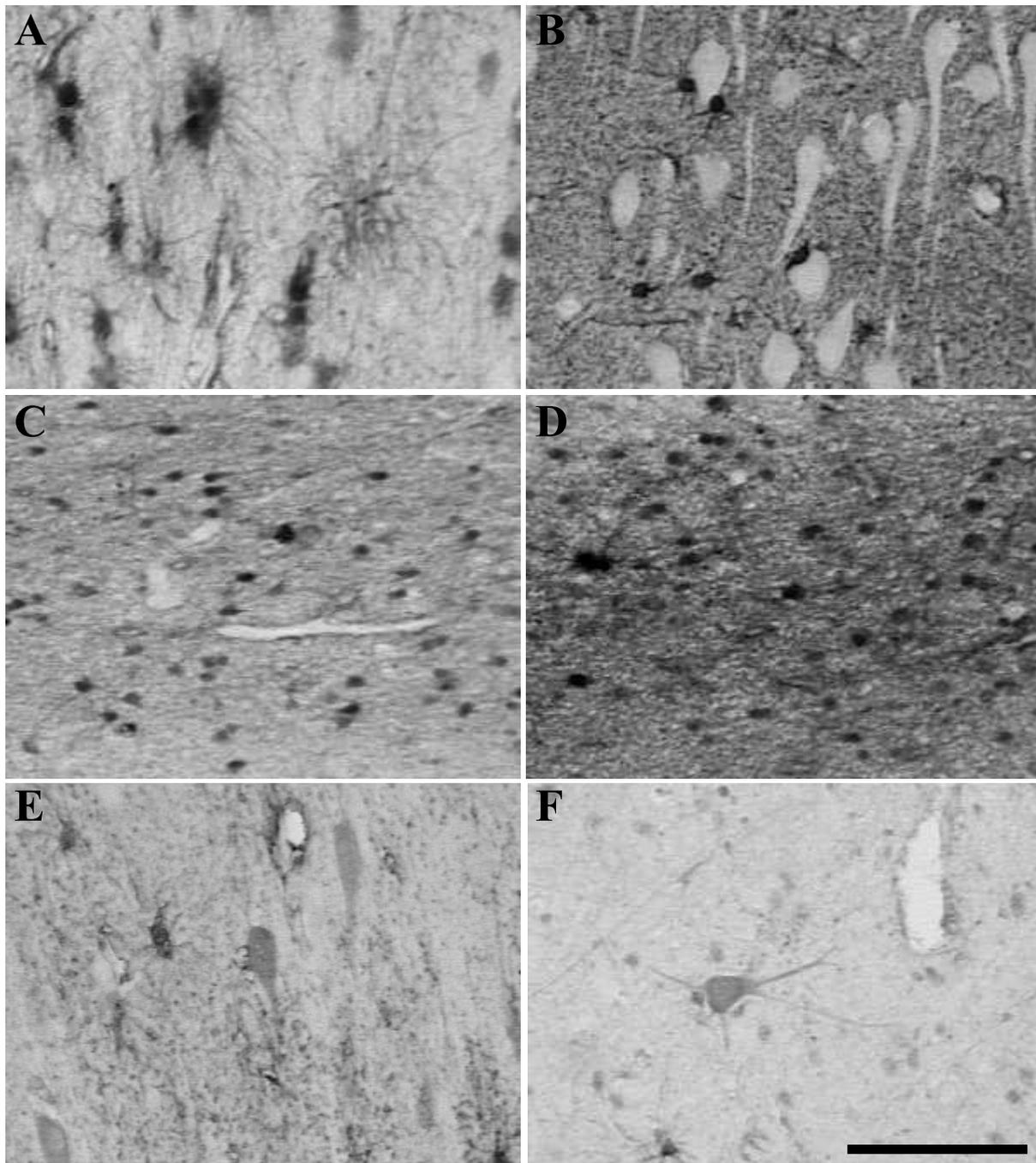
**Figura 29.** Secções hipocâmpais de casos do grupo tumor/displasia marcadas com anticorpo anti-HLA-DR na fascía dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbulo (G) e subúbulo (H). A barra em H indica 200 $\mu$ m.

#### **4.6. Metalotioneínas I e II**

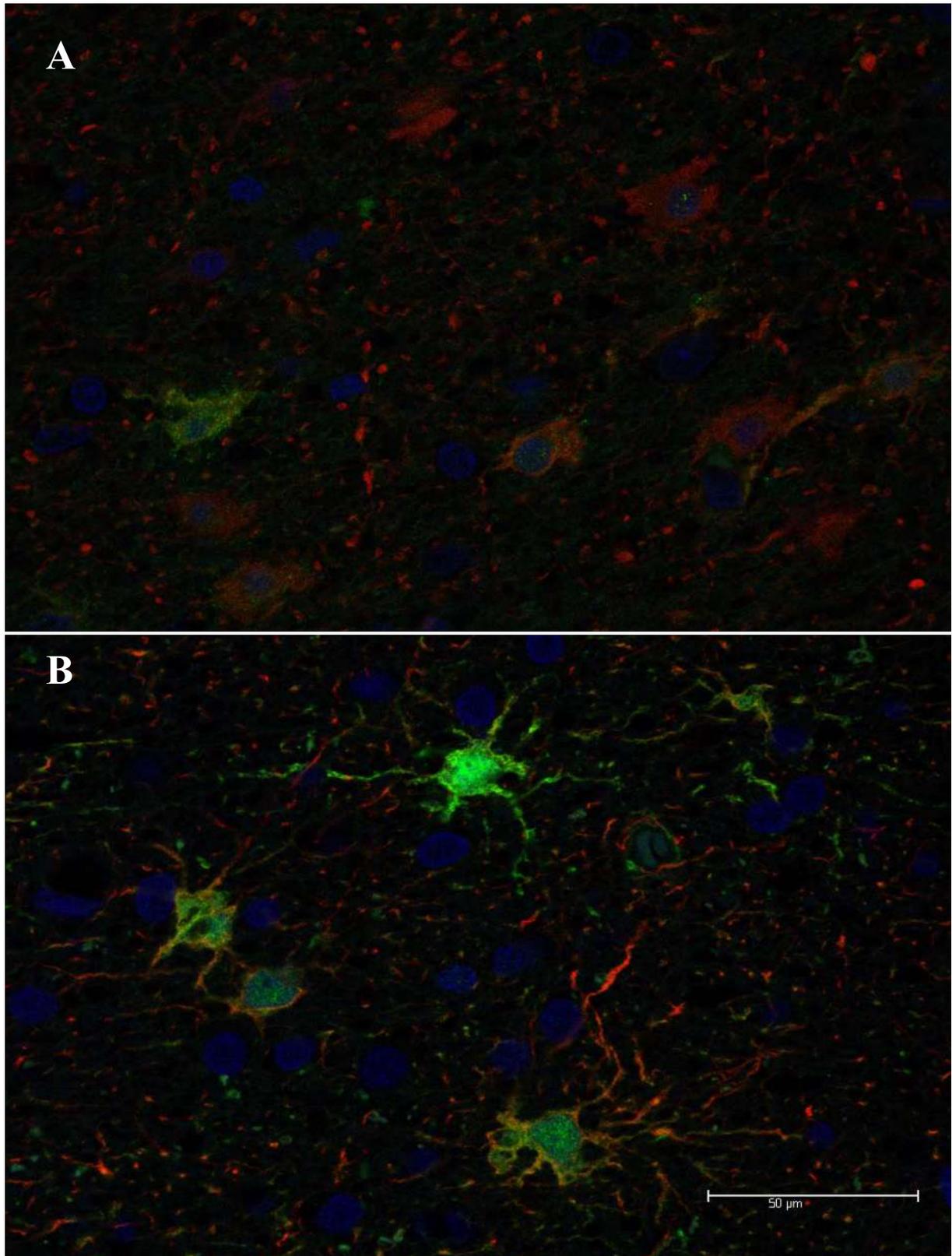
A imunohistoquímica para marcação das MT-I/II revelou marcação nuclear e citoplasmática homogênea da proteína principalmente em células com morfologia astrogliar (Figura 30 A-F). A dupla marcação confirmou a expressão de MT-I/II em astrócitos (Figura 31). Encontramos células com morfologia neuronal com marcação tênue em dois casos do grupo controle (Figura 30 E,F). Além da marcação celular, foi observada marcação extracelular, principalmente ao redor de células com morfologia astrogliar fortemente marcadas.

Houve aumento da marcação, em relação ao grupo Ctrl, em várias regiões dos grupos com ELT, com um padrão de aumento apenas em regiões naturalmente sem neurônios (camadas molecular externa, interna e subgranular) nos grupos ELT e nos estratos piramidais dos grupos ELTM (Figuras 32-38). Na camada molecular externa houve aumento da área marcada nos grupos VN, AG e TD em relação ao Ctrl (Ctrl=550±139, VN=1347±151, AL=1036±155, AG=1333±188, TD=1238±175; p=0,004). Na camada molecular interna do grupo TD houve maior área marcada em relação ao Ctrl (Ctrl=625, VN=1650, AL=1346, AG=1527, TD=2099; p=0,019). Não houve alteração na área expressando MT-I/II na camada granular (Ctrl=699±146, VN=1204±130, AL=1033±129, AG=1230±163, TD=1180±168; p=0,076). Todos os grupos ELT apresentaram aumento da área marcada em relação ao grupo Ctrl na camada subgranular (Ctrl=277, VN=2217, AL=1611, AG=2162, TD=2136; p<0,001). Os grupos ELTM apresentaram aumento da área marcada em relação ao grupo Ctrl no hilo (Ctrl=180, VN=869, AL=558, AG=1064, TD=956; p=0,002). Em CA4, o grupo AG apresentou aumento da área marcada em relação ao Ctrl (Ctrl=287, VN=851, AL=679, AG=1159, TD=405; p=0,03). Os grupos com atrofia apresentaram maior área expressando MT do que o grupo controle em CA3 (Ctrl=675±159, VN=1300±185, AL=1395±165, AG=1431±218, TD=1008±242; p=0,03) e CA2 (Ctrl=478, VN=1602, AL=1754, AG=1850, TD=872; p=0,005). Em CA1, todos os grupos ELTM apresentaram maior área marcada do que o grupo Ctrl e o grupo VN apresentou maior área em relação ao grupo TD (Ctrl=777±180, VN=1778±140, AL=1455±150, AG=1742±163, TD=1050±213; p<0,001) No prosúbiculo o grupo VN apresentou maior marcação do que o Ctrl (Ctrl=842±189, VN=1656±180, AL=1580±162, AG=1593±164, TD=1141±202; p=0,005). No subículo, o

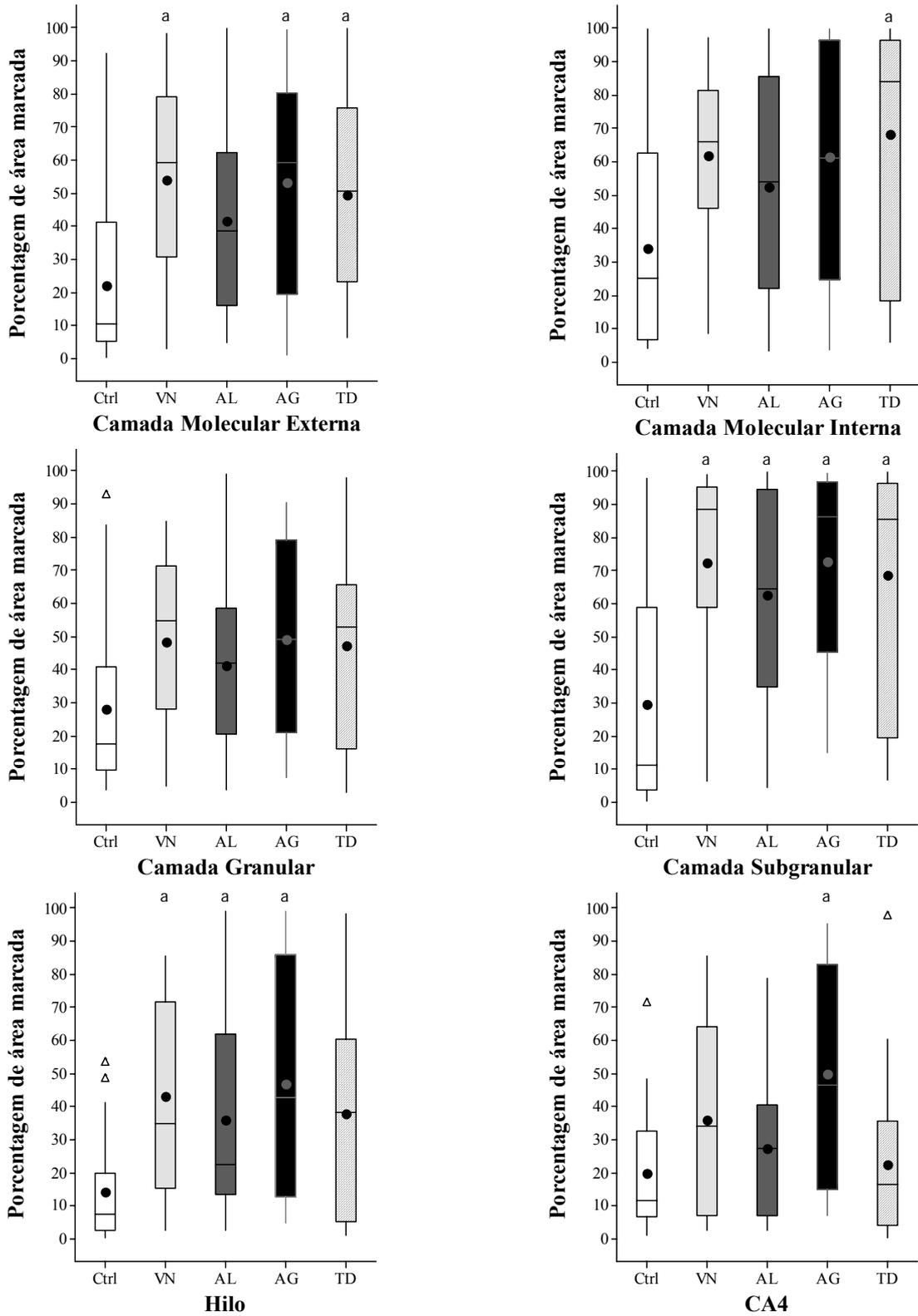
grupo AG apresentou maior área marcada do que o grupo Ctrl (Ctrl=780±135, VN=1384±181, AL=1434±164, AG=1823±154, TD=1143±212; p=0,001).



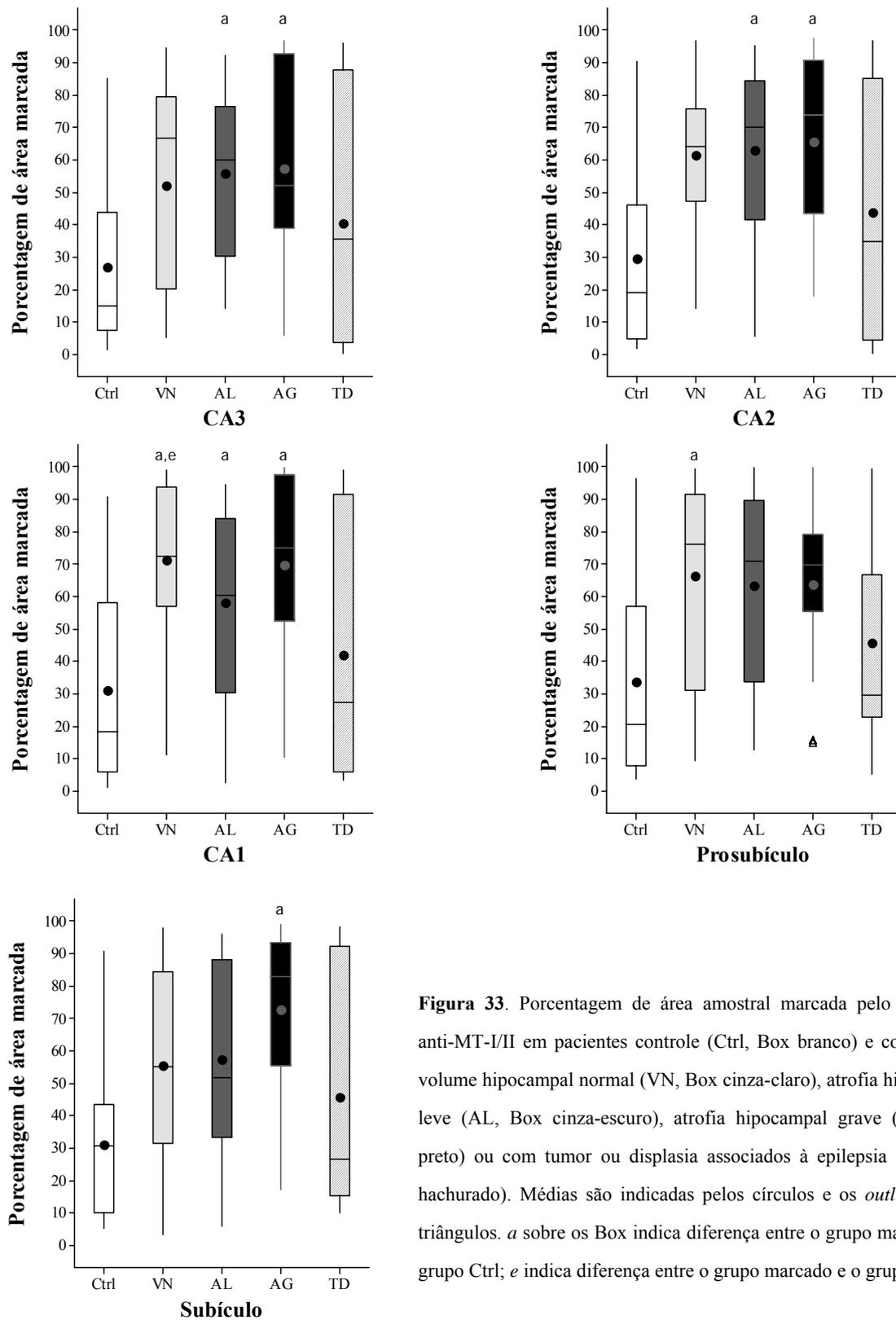
**Figura 30.** Imagens representativas da imunohistoquímica para MT-I/II em secções hipocâmpais de pacientes com ELT (A-D) e do grupo Ctrl (E-F). Observar que as células marcadas apresentam formas e tamanhos compatíveis com astrócitos. Em raros casos, apenas dentro do grupo controle, observam-se células maiores, com morfologia de neurônios piramidais (E) ou interneurônios hilares (F) levemente marcados pelo anticorpo. Ainda, o meio extracelular pode apresentar diferentes níveis de marcação, como visto nas imagens de CA1 de diferente pacientes (C e D). Esta marcação é compatível com a liberação de metalotioneínas no meio por astrócitos. Nas imagens temos camada molecular interna (A), subículo (B,E), CA1 (C,D) e hilo (F). A barra em F indica 100µm.



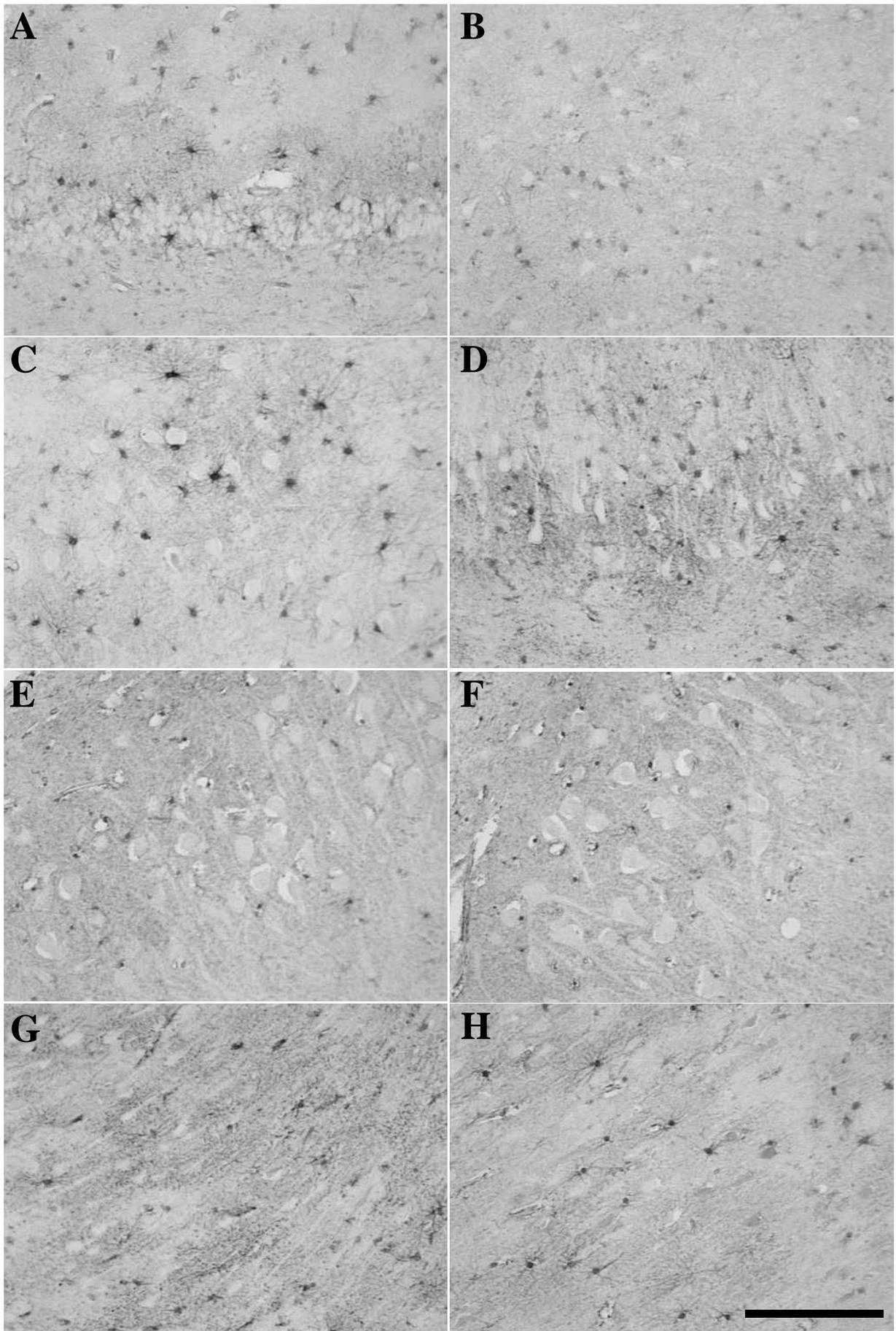
**Figura 31.** Colocalização de MT-I/II (verde) com GFAP (vermelho) no grupo Ctrl (A) e ELT (B). Observar que no grupo ELT há aumento da marcação para MT-I/II nos astrócitos do grupo ELT comparados com os do grupo Ctrl. Assim como na peroxidase, a marcação para MT-I/II, além do soma, também é visível dentro do núcleo das células (azul), assim como nos prolongamentos proximais. A barra em B indica 50  $\mu\text{m}$ .



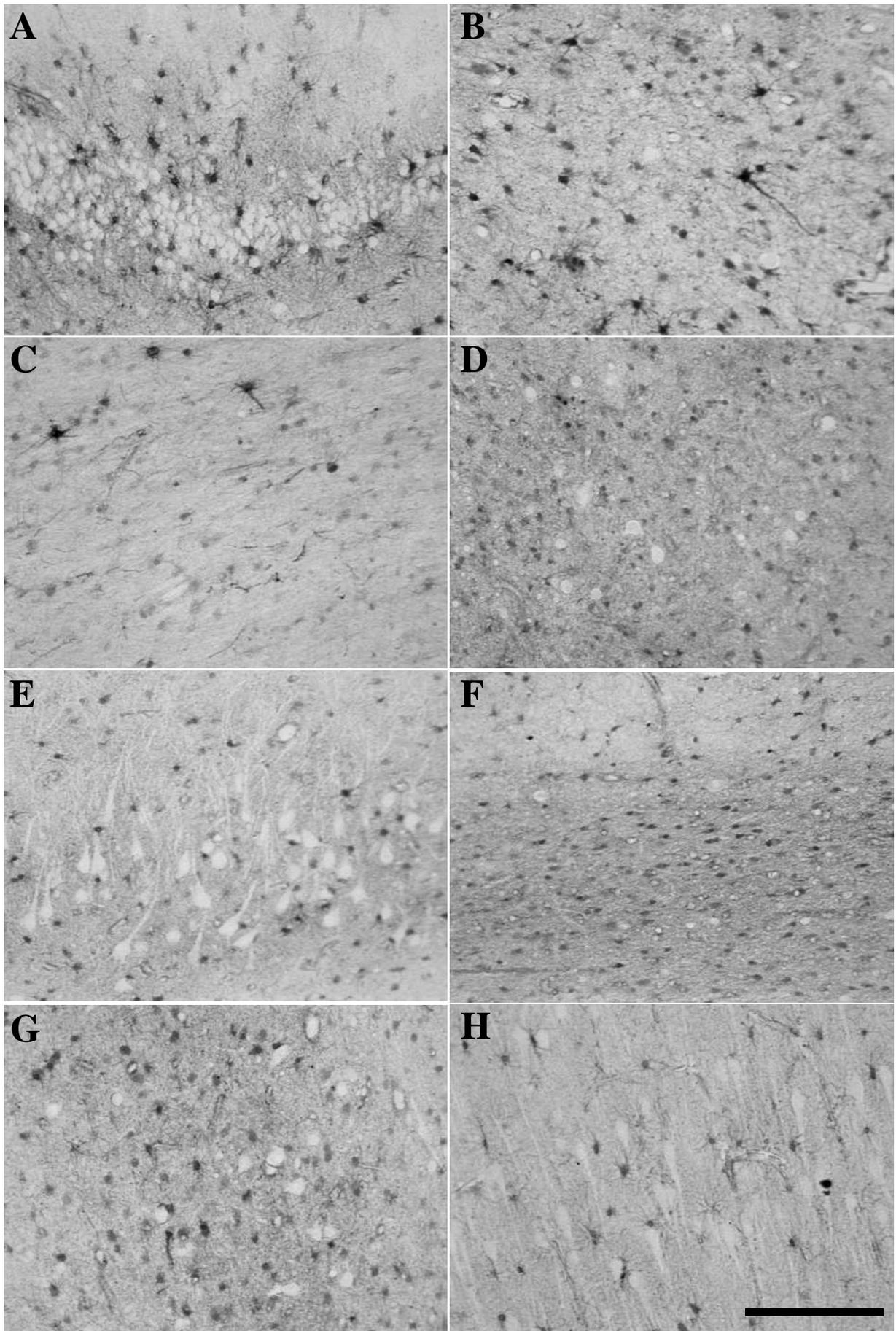
**Figura 32.** Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-MT-I/II em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os *outliers* pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



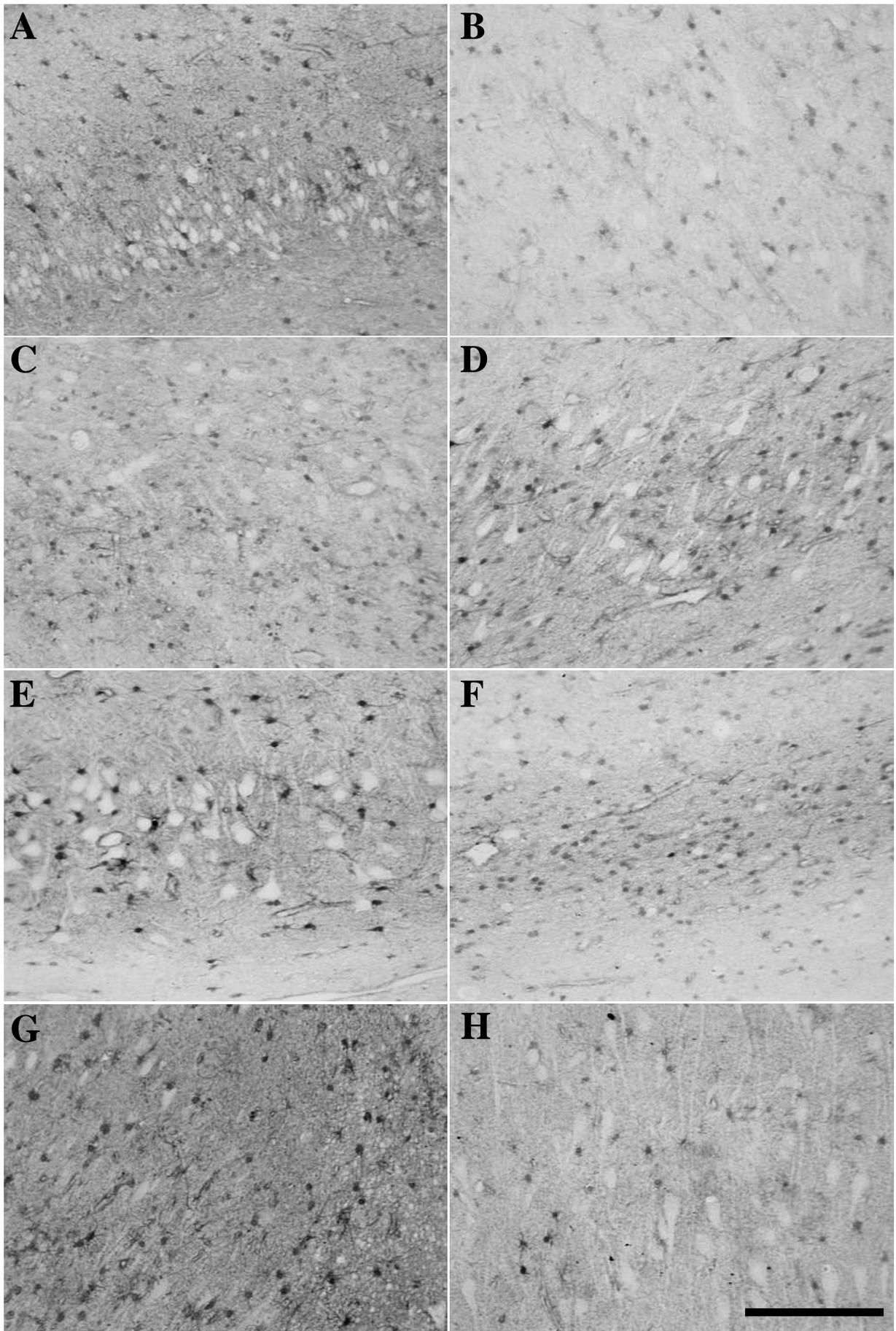
**Figura 33.** Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-MT-I/II em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os *outliers* pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



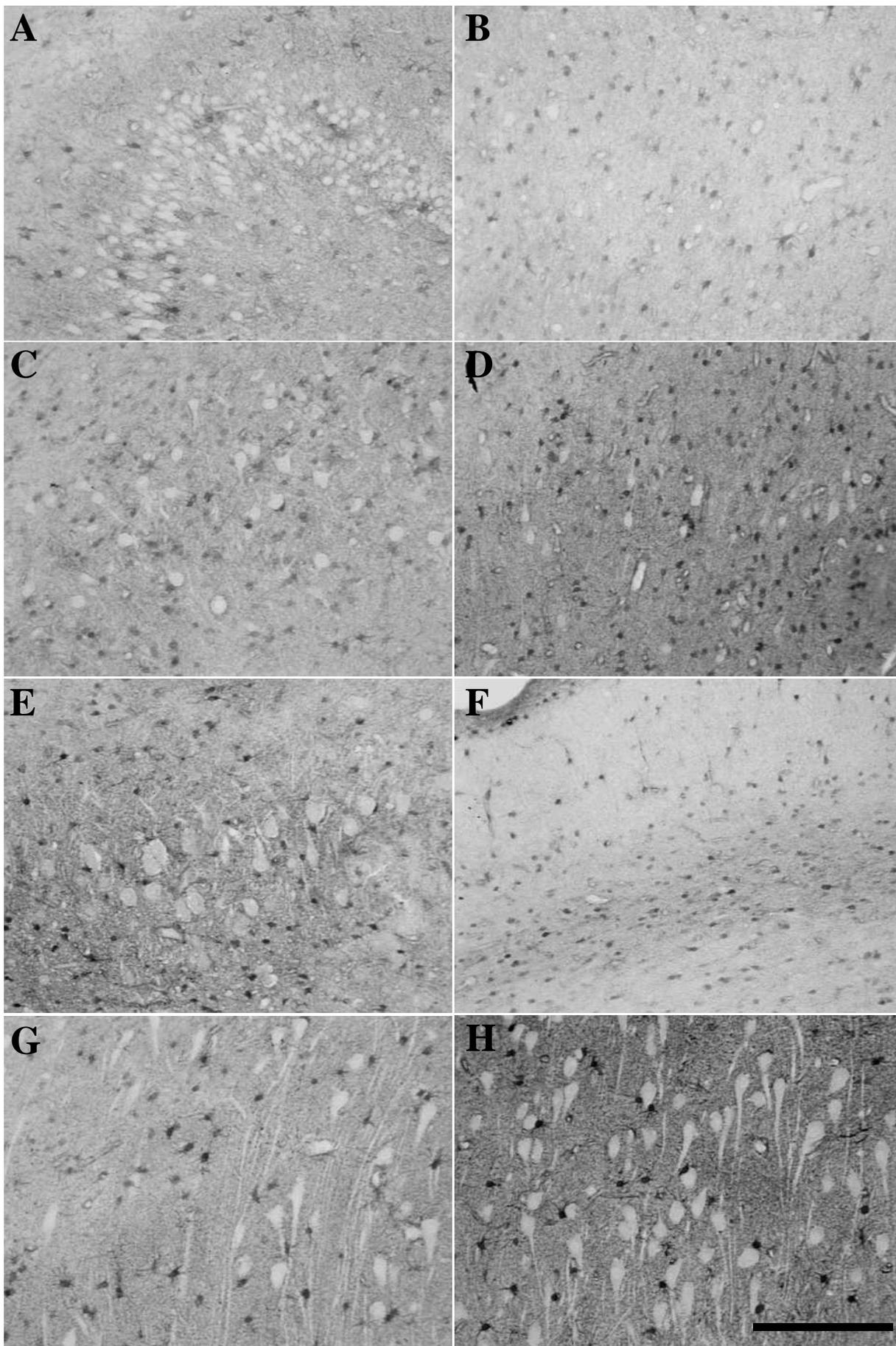
**Figura 34.** Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com anticorpo anti-MT-I/II na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbicúlo (G) e subúbicúlo (H). A barra em H indica 200µm.



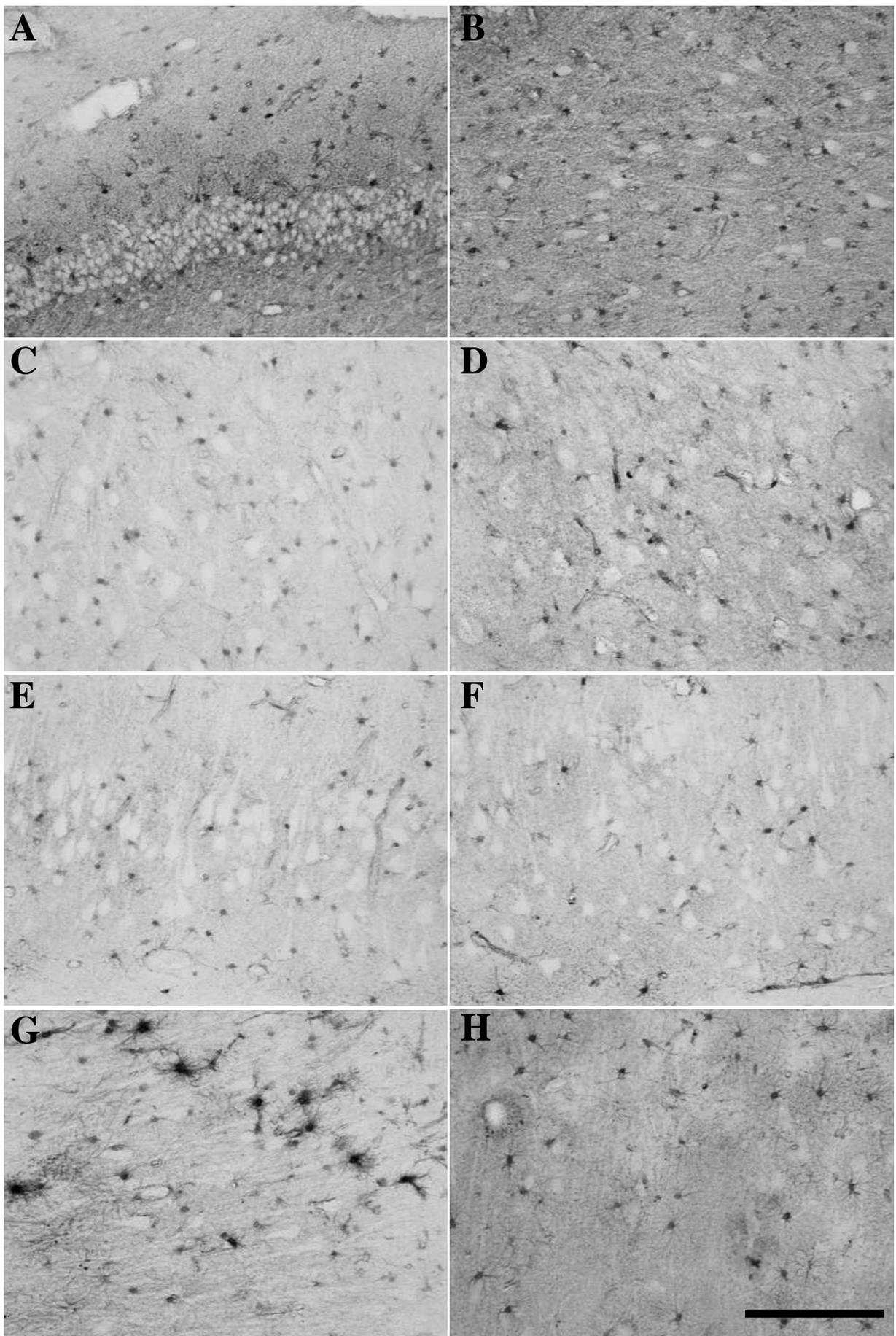
**Figura 35.** Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com anticorpo anti-MT-I/II na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbulo (G) e subúbulo (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 36.** Seções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com anticorpo anti-MT-I/II na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbicula (G) e subúbicula (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 37.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com anticorpo anti-MT-I/II na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbicula (G) e subúbicula (H). A barra em H indica 200µm.

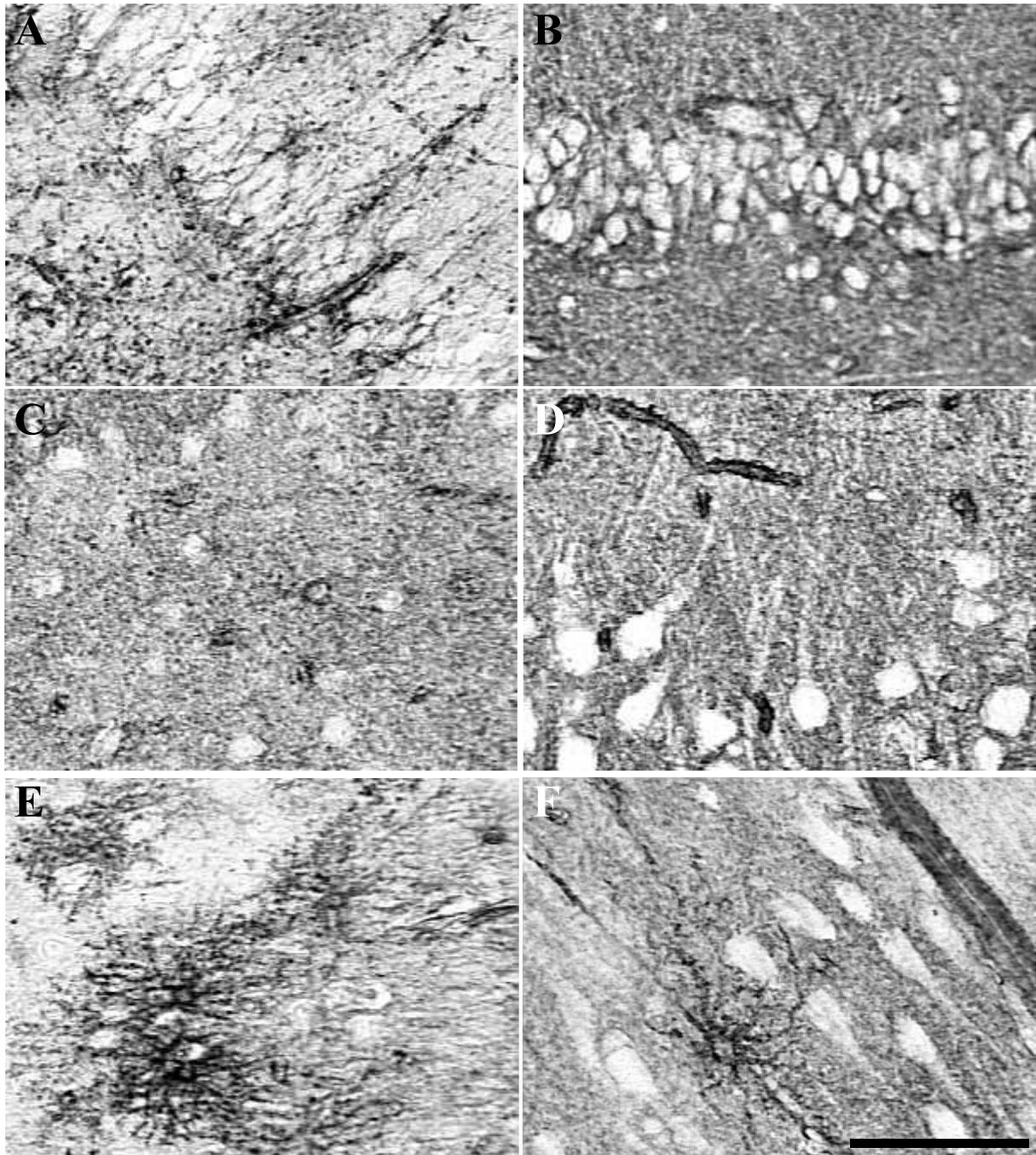


**Figura 38.** Secções hipocâmpais de casos do grupo tumor/displasia marcadas com anticorpo anti-MT-I/II na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbiculo (G) e subículo (H). A barra em H indica 200µm.

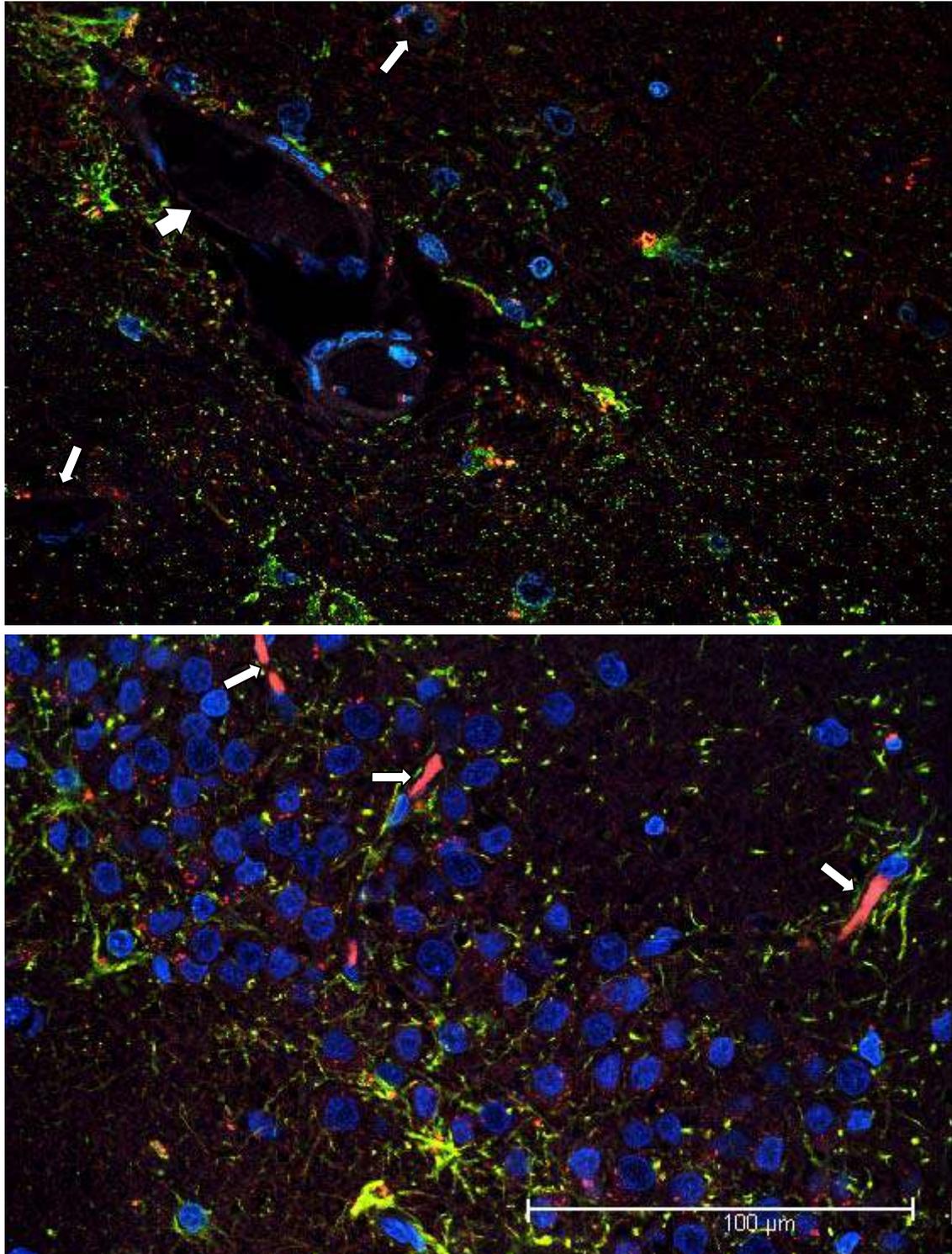
#### **4.7. Aquaporina 4**

A imunohistoquímica para detecção de AQP4 revelou diferenças de padrão de expressão entre o grupo Ctrl e os demais grupos (Figuras 39). No Ctrl, a AQP4 encontra-se principalmente nos pés perivasculares dos astrócitos (Figura 39 A), dando ao vaso pouca definição (Figura 39 C). Ainda, houve algumas células com morfologia astrogliar com soma marcado, principalmente no estrato piramidal do subículo e no hilo e camadas moleculares (Figura 39 E). Nos grupos ELT, o endotélio dos vasos estava mais marcado (Figura 39 D), sendo raro encontrar pés perivasculares marcados. Em poucos casos encontrou-se soma de astrócitos marcados, sendo que nestes casos encontrou-se menor quantidade de astrócitos na secção (Figura 39 F). A marcação de fundo também se encontra mais homogênea nos grupos ELT (Figura 39 B,D,F). A dupla marcação mostrou maior definição da marcação endotelial no grupo ELT (Figura 40 B) e presença de AQP4 em astrócitos (Figura 40 A).

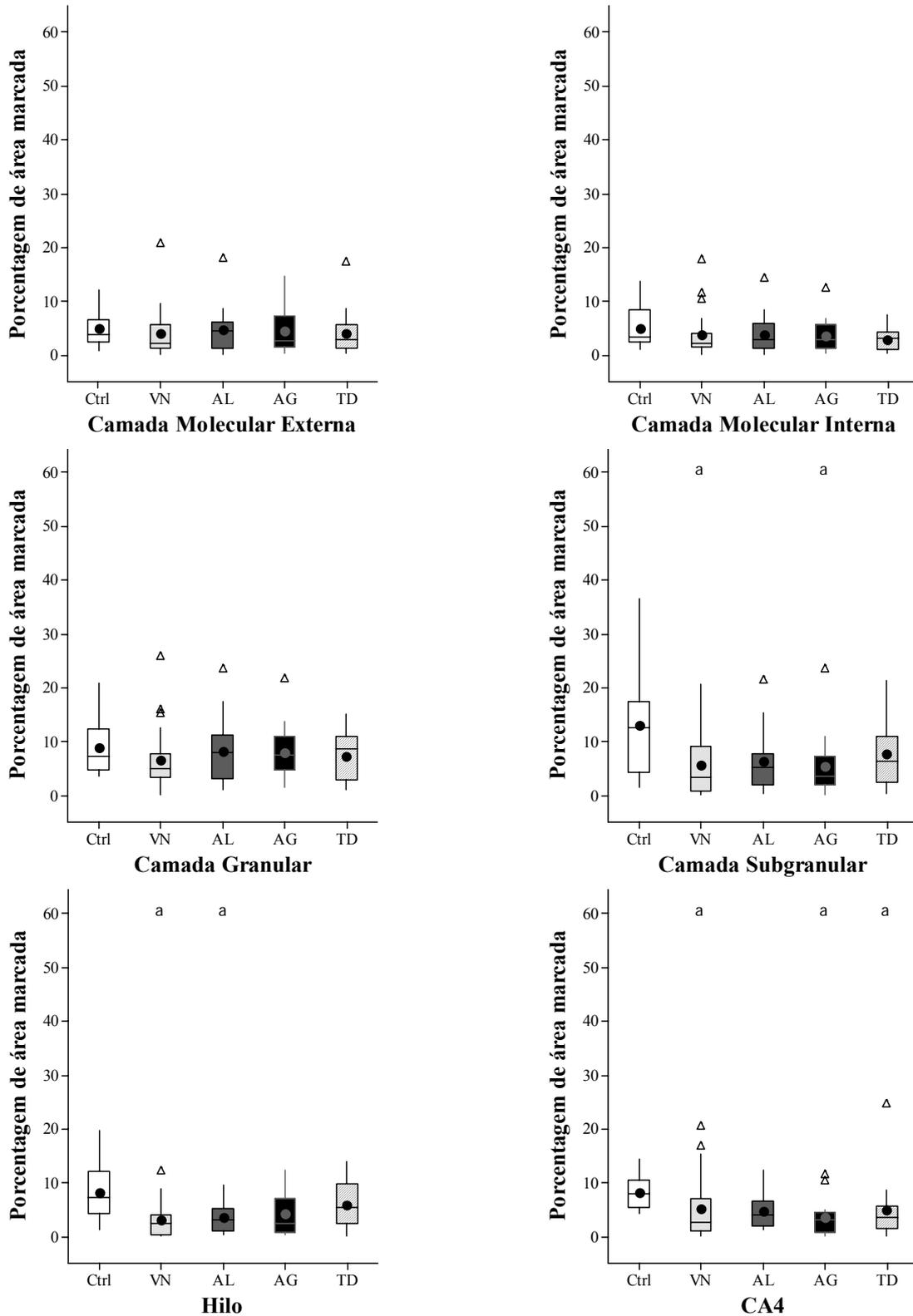
Não houve diferença na área marcada por AQP4 entre os grupos na camada molecular externa (Ctrl=98, VN=56, AL=114, AG=68, TD=71;  $p=0,452$ ), camada molecular interna (Ctrl=86, VN=56, AL=73, AG=69, TD=76;  $p=0,430$ ), camada granular (Ctrl=183, VN=123, AL=195, AG=184, TD=214;  $p=0,344$ ), CA3 (Ctrl=224, VN=108, AL=234, AG=156, TD=173;  $p=0,671$ ), CA2 (Ctrl=159, VN=125, AL=149, AG=208, TD=222;  $p=0,714$ ), prosúbiculo (Ctrl=261, VN=257, AL=136, AG=176, TD=234;  $p=0,391$ ) e subículo (Ctrl=253, VN=221, AL=148, AG=137, TD=161;  $p=0,074$ ). Houve redução da área marcada na camada subgranular dos grupos VN e AG em relação ao Ctrl (Ctrl=319, VN=81, AL=127, AG=89, TD=161;  $p=0,011$ ). No hilo dos grupos VN e AL houve redução da marcação em comparação com o Ctrl (Ctrl=179, VN=62, AL=78, AG=62, TD=135;  $p=0,002$ ). Em CA4 dos grupos VN, AG e TD houve menor área marcada do que o Ctrl (Ctrl=194, VN=63, AL=97, AG=75, TD=88;  $p=0,001$ ). Em CA1 do grupo AG houve redução da área marcada em relação ao Ctrl (Ctrl=176, VN=70, AL=89, AG=67, TD=249;  $p=0,009$ ).



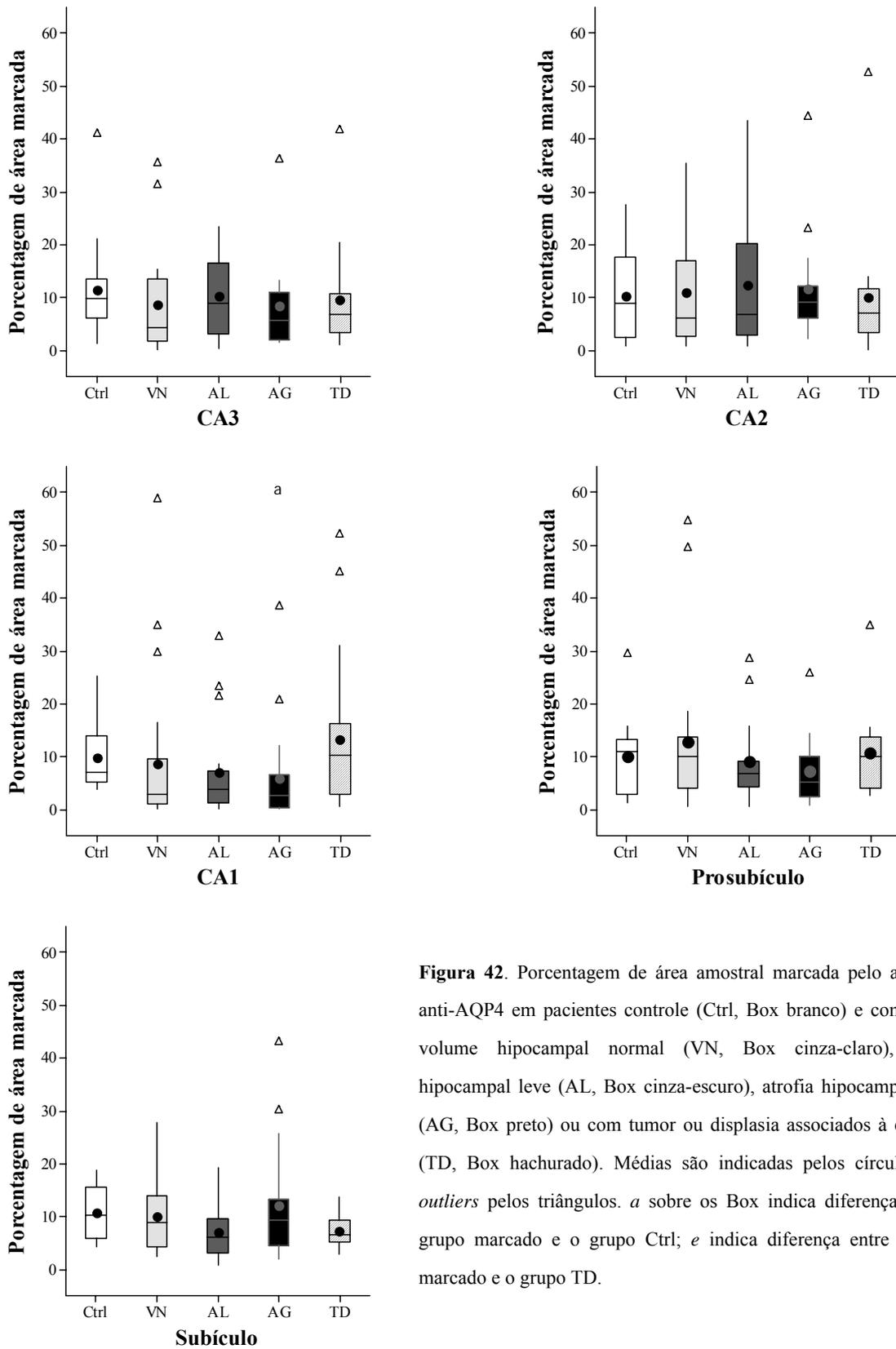
**Figura 39.** Imagens representativas da imunohistoquímica para AQP4 em secções hipocâmpais de pacientes com ELT (B,D,F) e do grupo Ctrl (A,C,E). Em vista geral, nota-se o contraste entre a marcação heterogênea no grupo Ctrl (A) e a marcação mais homogênea e forte do grupo ELT (B). Os vasos, que aparecem bem definidos nos grupos ELT (D), são mais claros e menos distintos no grupo Ctrl (C). A marcação nos corpos dos astrócitos é comum no grupo controle, onde estas células apresentam marcação dispersa em todos os prolongamentos, definindo o formato dos astrócitos protoplasmáticos ainda melhor do que o GFAP (E). Nos grupos ELT, os astrócitos são mais raramente observados e a marcação revela formato que lembra os astrócitos fibrosos da substância branca (F). Nas imagens temos camada granular (A,B), CA1 (C), CA2 (D) e subículo (E,F). A barra em F indica 100µm.



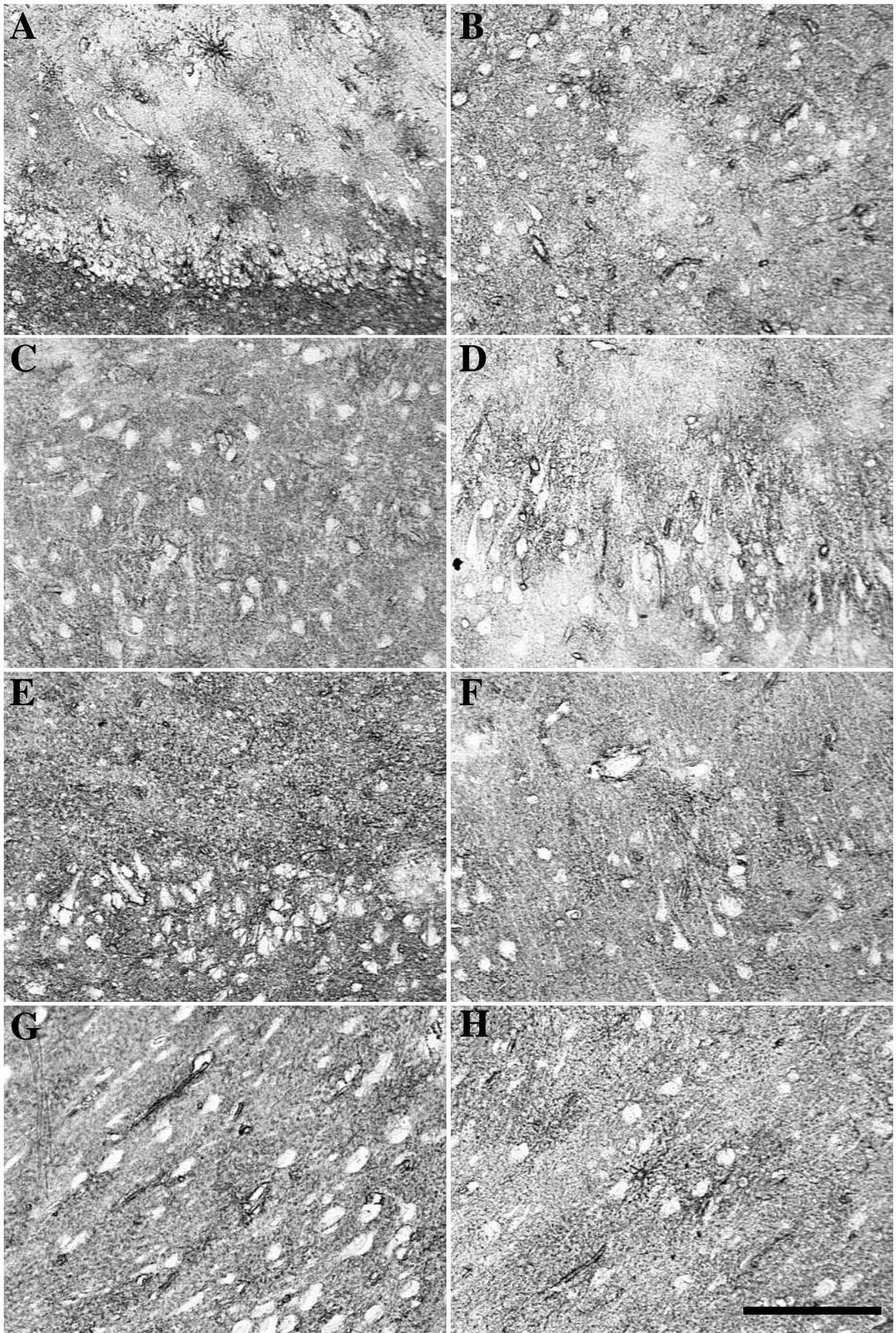
**Figura 40.** Colocalização de AQP4 (vermelho) com GFAP (verde) no hilo do grupo Ctrl (A) e na camada granular do grupo ELT (B). Observar que no grupo ELT há maior marcação perivascular (setas em B) quando comparados com o grupo Ctrl (seta pequena em A). Pode-se observar que em vasos de maior calibre (seta grande em A) a marcação é bem mais tênue do que nos capilares e vasos menores (seta pequena em A). Comparando-se ELT (B) e Ctrl (A) pode-se observar que a marcação de fundo de AQP4 em B é mais homogênea e fracamente marcada, enquanto em A observam-se pontos vermelhos mais intensos no fundo.



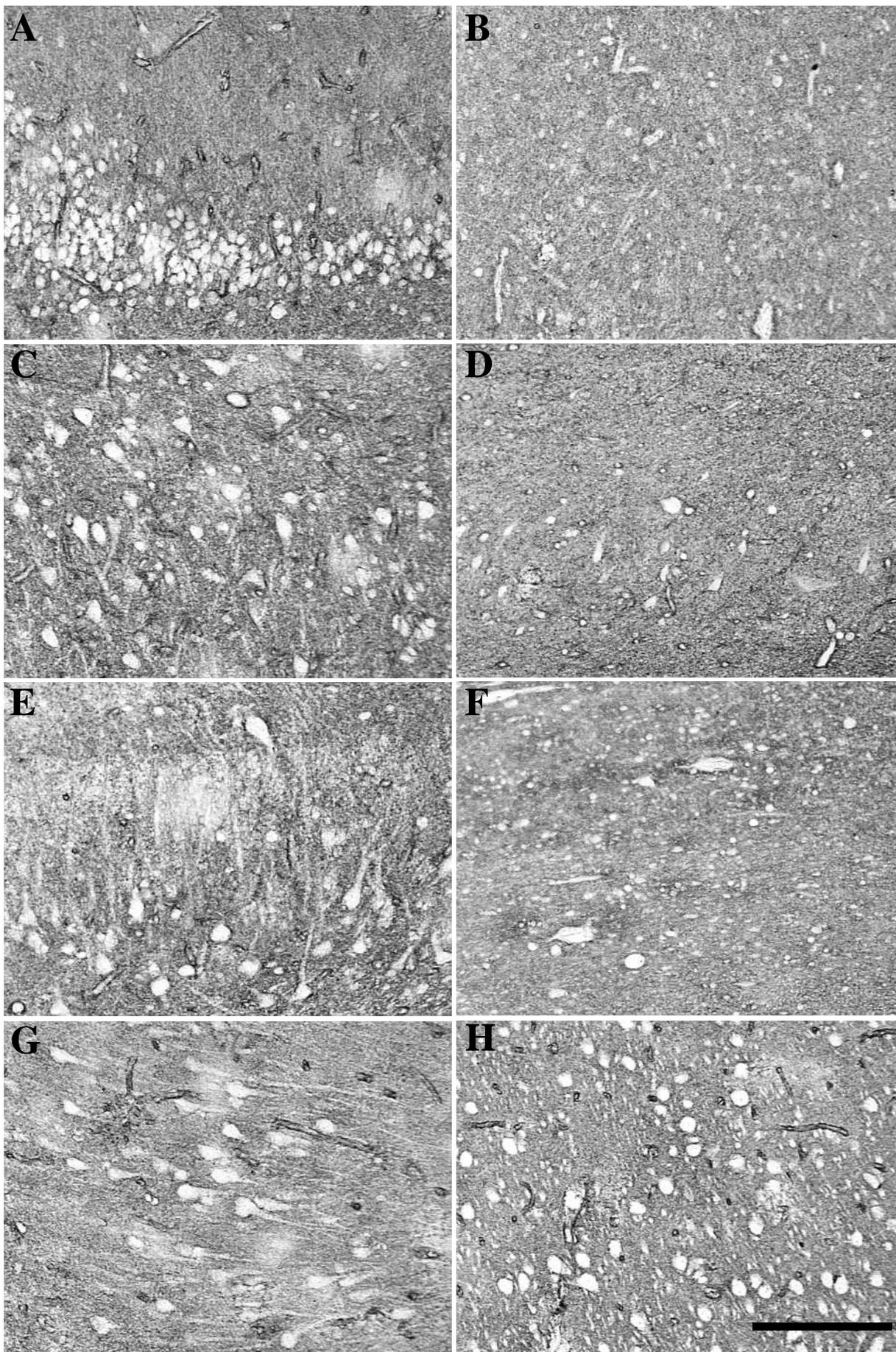
**Figura 41.** Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-AQP4 em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os *outliers* pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



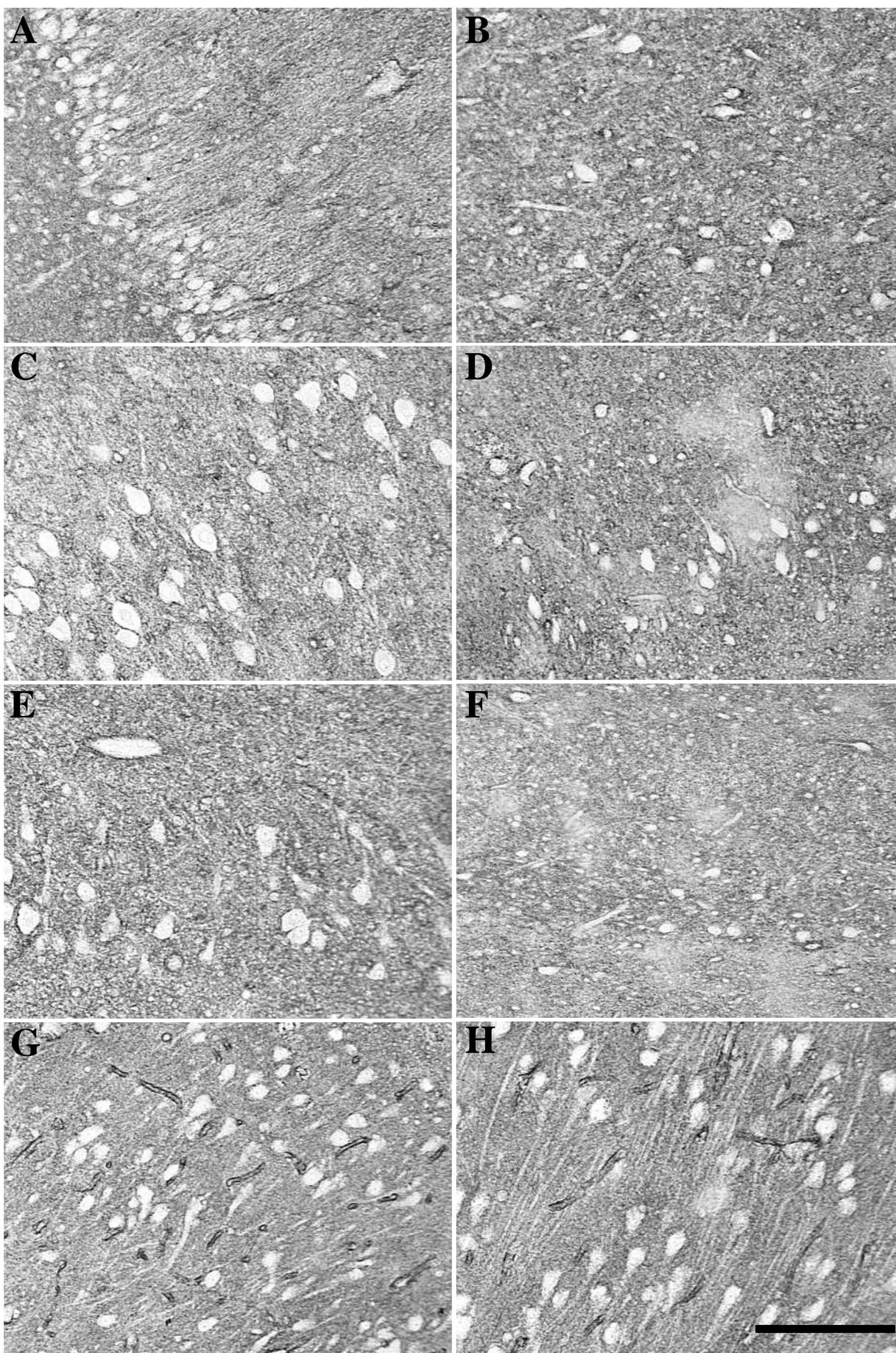
**Figura 42.** Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-AQP4 em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os outliers pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



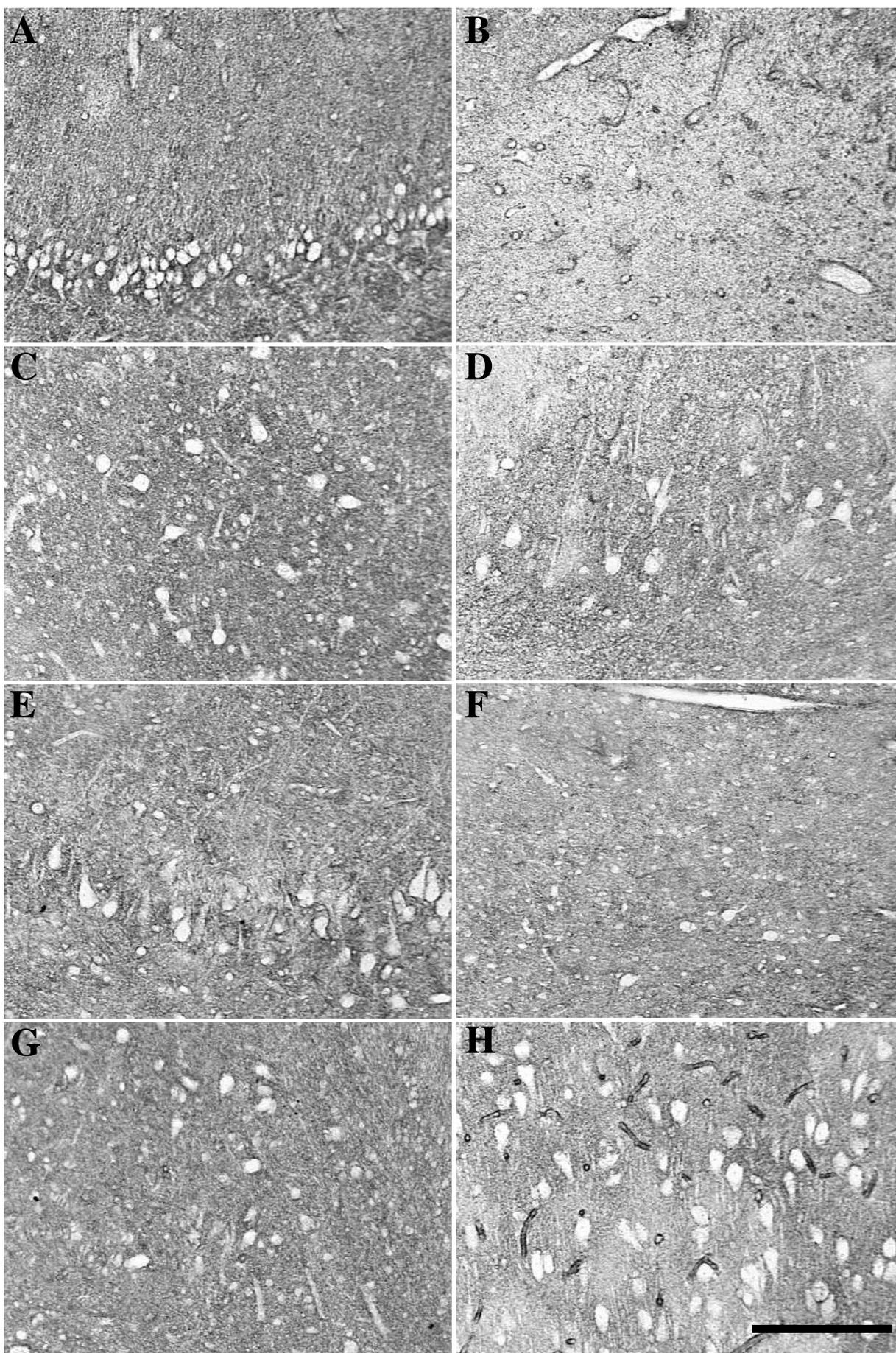
**Figura 43.** Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com anticorpo anti-AQP4 na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbicula (G) e subículo (H). A barra em H indica 200µm.



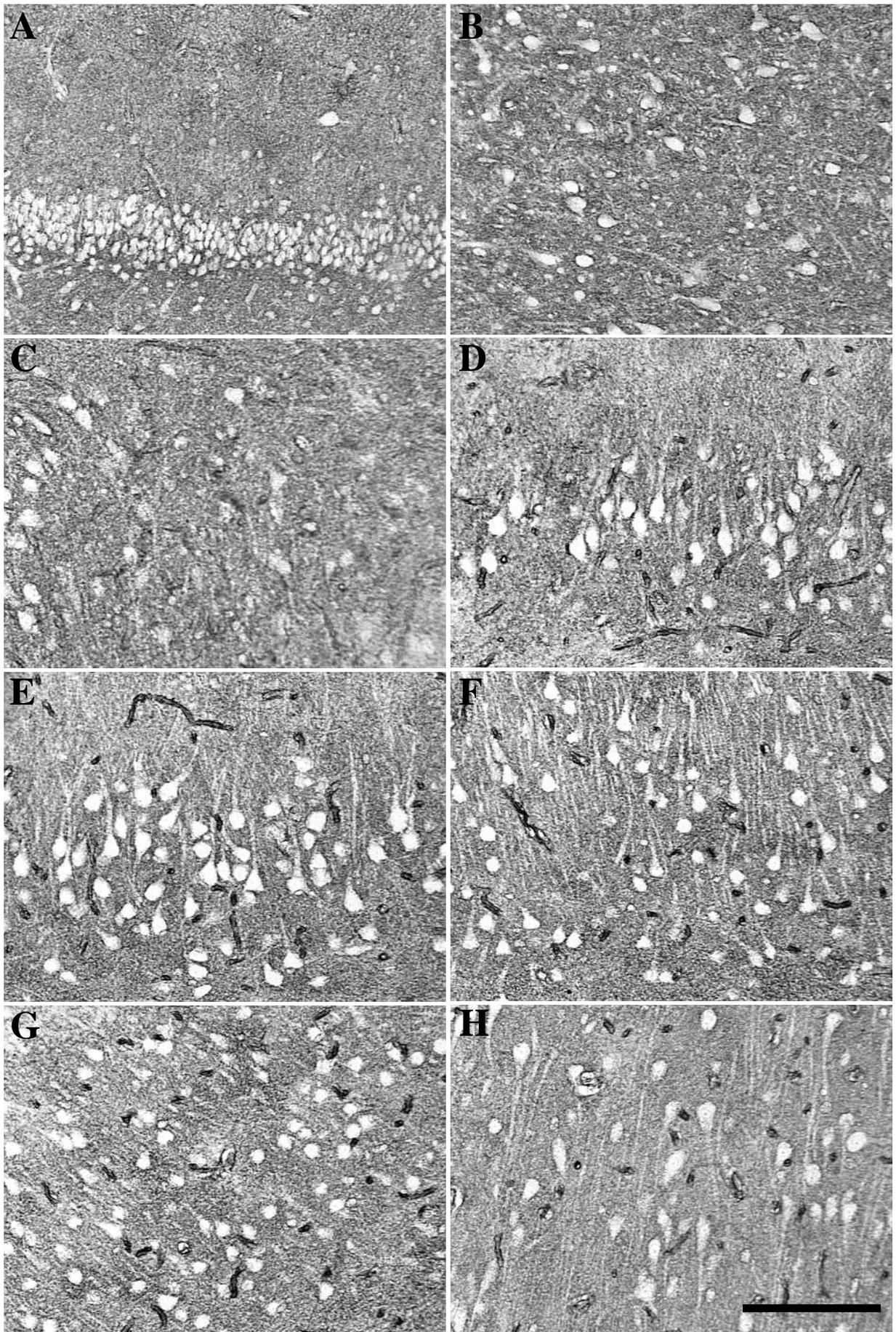
**Figura 44.** Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com anticorpo anti-AQP4 na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbicúlo (G) e subúbicúlo (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 45.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com anticorpo anti-AQP4 na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbiculo (G) e subúbiculo (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 46.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com anticorpo anti-AQP4 na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbulo (G) e subúbulo (H). A barra em H indica 200µm.



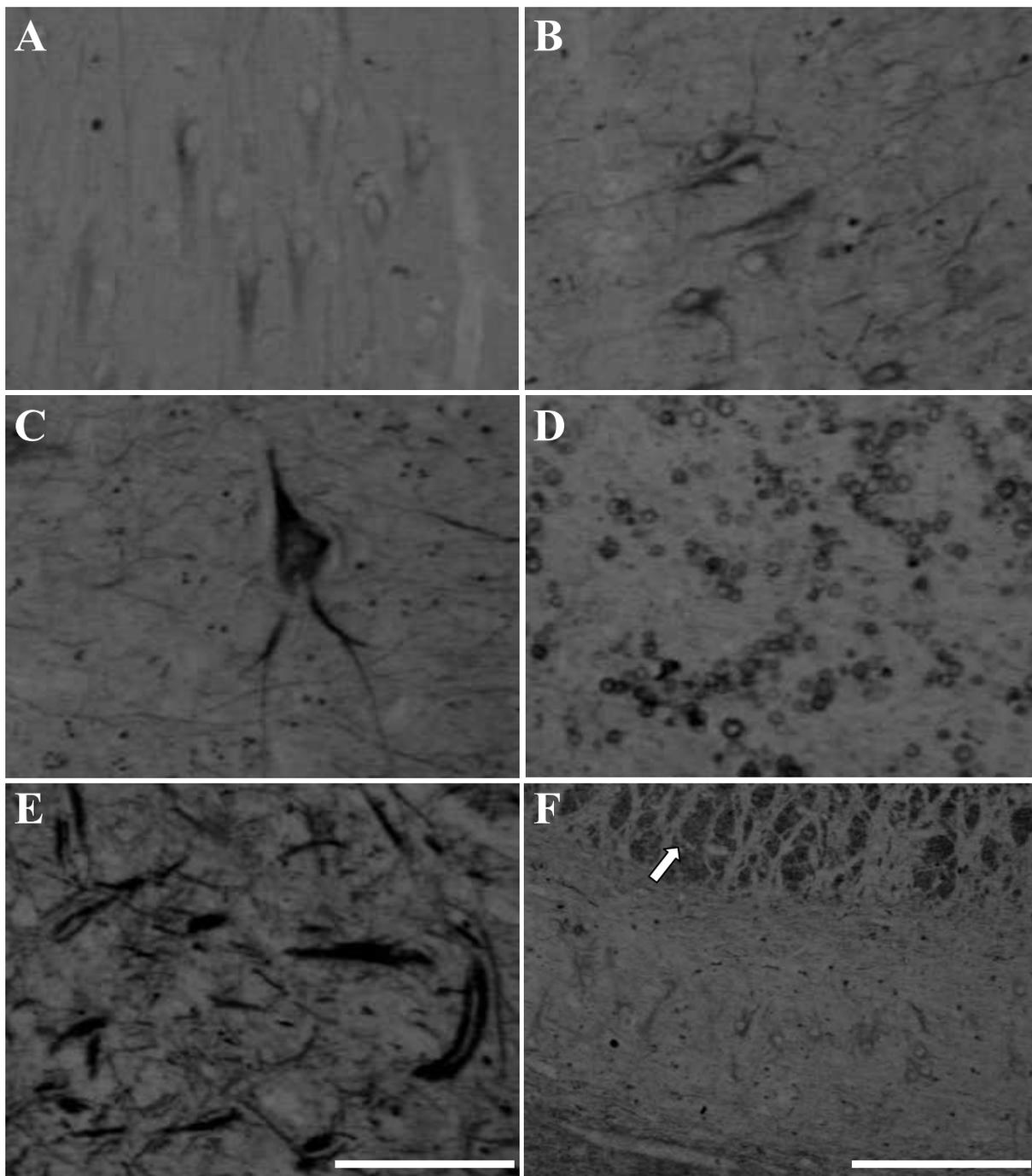
**Figura 47.** Seções hipocâmpais de casos do grupo tumor/displasia marcadas com anticorpo anti-AQP4 na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbicúlo (G) e subúbicúlo (H). A barra em H indica 200µm.

#### **4.8. Condroitin Sulfato**

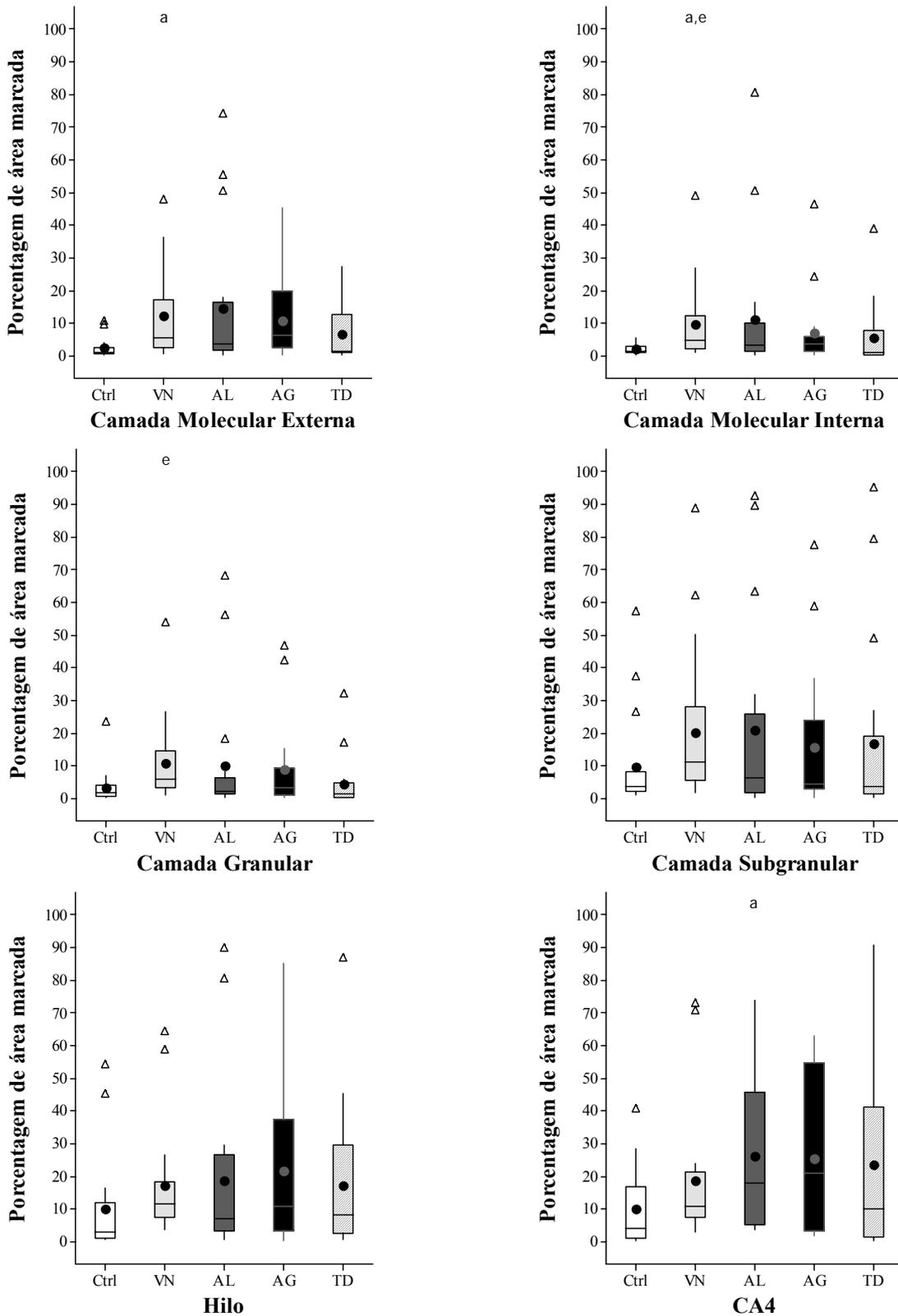
O anticorpo para condroitin sulfato marcou principalmente o meio extracelular, mas também o citoplasma de algumas células com morfologia de neurônios e astrócitos (Figura 48). No meio extracelular, o anticorpo revelou a presença de fibras finas de condroitin sulfato em todas as regiões, com grande concentração em regiões ricas em fibras (Figura 48 A-C,E). Em geral, estas fibras são pouco visíveis nos controles e bem definidas e mais espessas nos pacientes com ELT. Ainda, em ambos há maior concentração de fibras nas regiões axonais, notadamente nas fibras mielínicas que originarão o fórnix e nas fibras da via perforante (Figura 48 F). Quanto às células, os neurônios apresentam marcação tênue em todos os grupos, principalmente nos neurônios piramidais de CA1, prosubículo e parte dos neurônios do subículo (Figura 48 A-C). As células astrogliais marcadas aparecem principalmente em CA1 dos pacientes com ELT, sendo raras em outras regiões (Figura 48 D). O limiar definido para a avaliação do anticorpo anti-CS-56 excluiu a maioria da marcação neuronal, que era demasiadamente tênue e muitas vezes confundia-se com a marcação de fundo. Este limiar incluiu os neurônios com marcação mais forte, todas as células astrogliais marcadas (cuja marcação é normalmente mais forte que a neuronal) e as fibras do meio extracelular.

Houve aumento da área imunopositiva para CS-56 em várias regiões dos grupos ELTM em relação aos grupos Ctrl e TD (Figuras 49-55). Na camada molecular externa o grupo VN apresentou área imunopositiva maior que o grupo Ctrl (Ctrl=27, VN=142, AL=94, AG=157, TD=33;  $p=0,005$ ). Na camada molecular interna o grupo VN apresentou maior área que os grupos Ctrl e TD (Ctrl=38, VN=121, AL=78, AG=91, TD=20;  $p=0,012$ ). Na camada granular, o grupo VN apresentou área maior que o grupo TD (Ctrl=40, VN=148, AL=58, AG=78, TD=31;  $p=0,017$ ). O grupo AL apresentou maior área imunopositiva que o grupo Ctrl em CA4 (Ctrl=46, VN=271, AL=491, AG=322, TD=309;  $p=0,029$ ) e CA3 (Ctrl=81, VN=429, AL=579, AG=270, TD=147;  $p=0,024$ ). O grupo VN apresentou maior área do que os grupos Ctrl e TD em CA2 (Ctrl=102, VN=443, AL=264, AG=207, TD=60;  $p<0,001$ ) e CA1 (Ctrl=81, VN=402, AL=228, AG=204, TD=66;  $p<0,001$ ). No prosubículo, todos os grupos ELTM apresentaram áreas imunopositivas maiores que o grupo Ctrl e o grupo VN apresentou área maior que o grupo TD (Ctrl=40, VN=325, AL=210, AG=328, TD=85;

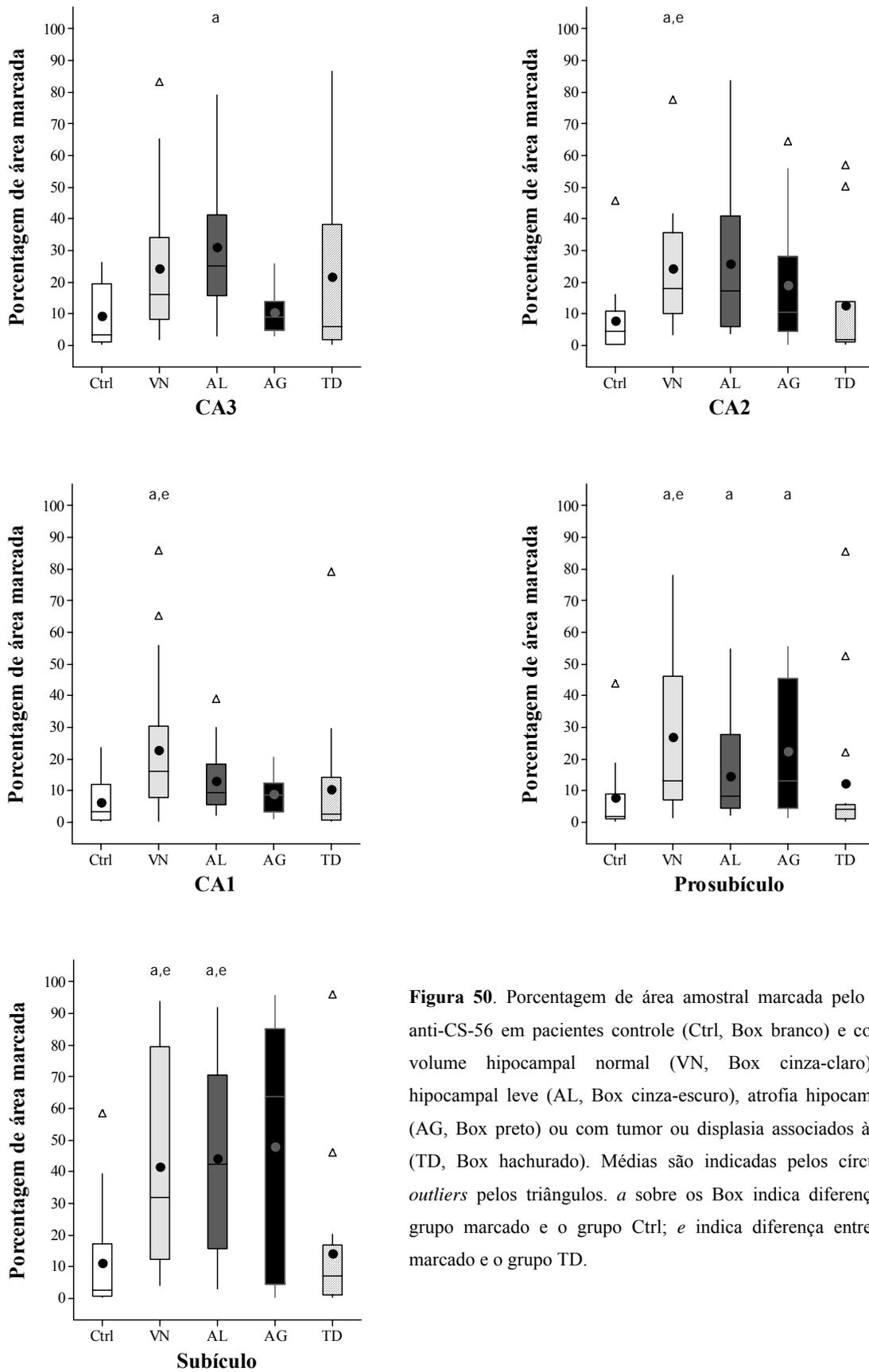
p<0,001). Os grupos VN e AL apresentaram maior área que os grupos Ctrl e TD no subículo (Ctrl=62, VN=791, AL=1054, AG=1595, TD=173; p<0,001). Não houve diferença entre os grupos na camada subgranular (Ctrl=90, VN=289, AL=126, AG=150, TD=103; p=0,114) e hilo (Ctrl=72, VN=283, AL=177, AG=268, TD=203; p=0,137).



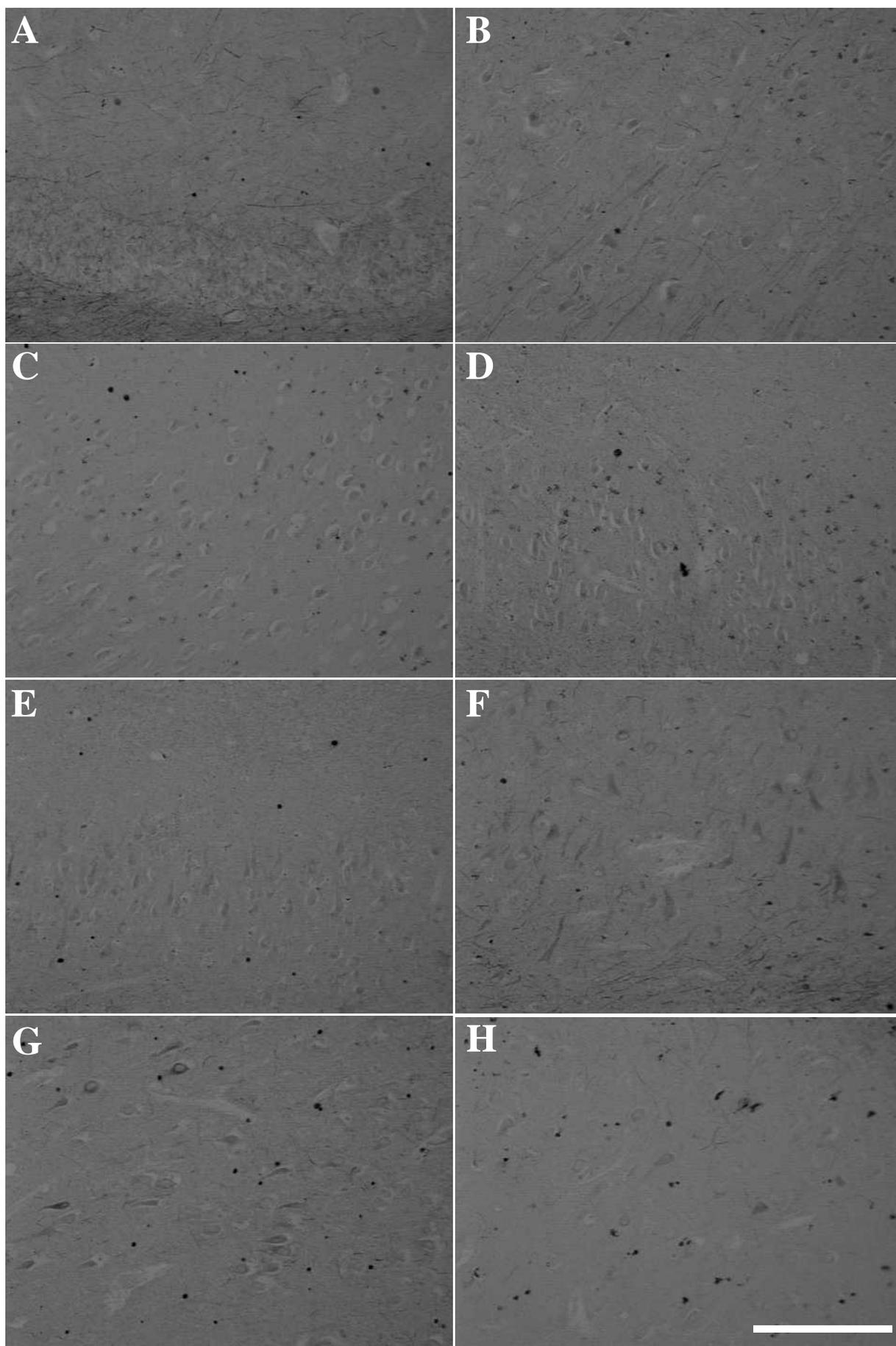
**Figura 48.** Imagens representativas da imunohistoquímica para CS em secções hipocâmpais de pacientes com ELT. Os neurônios, quando marcados, apresentam tênue marcação (A), embora por vezes possam ser fortemente marcados (B,C). A marcação neuronal concentra-se principalmente no soma, mas não são raras marcações em dendritos apicais (A,B) ou basais (C). Os astrócitos apresentam marcação estritamente somática (D) e em nenhum caso foi observada marcação no núcleo ou prolongamentos destas células. Na região CA4 (E) é comum encontrar grande emaranhado de fibras positivas para CS-56, sendo que estas seguem o padrão da via camada granular-CA3. Em F, nota-se a grande marcação da via perfurante (seta). Nas imagens temos subículo (A), prosubículo (B), hilo (C), CA1 (D), CA4 (E) e CA2 (F). A barra em E indica 100µm e vale para as figuras A-E e em F indica 200µm.



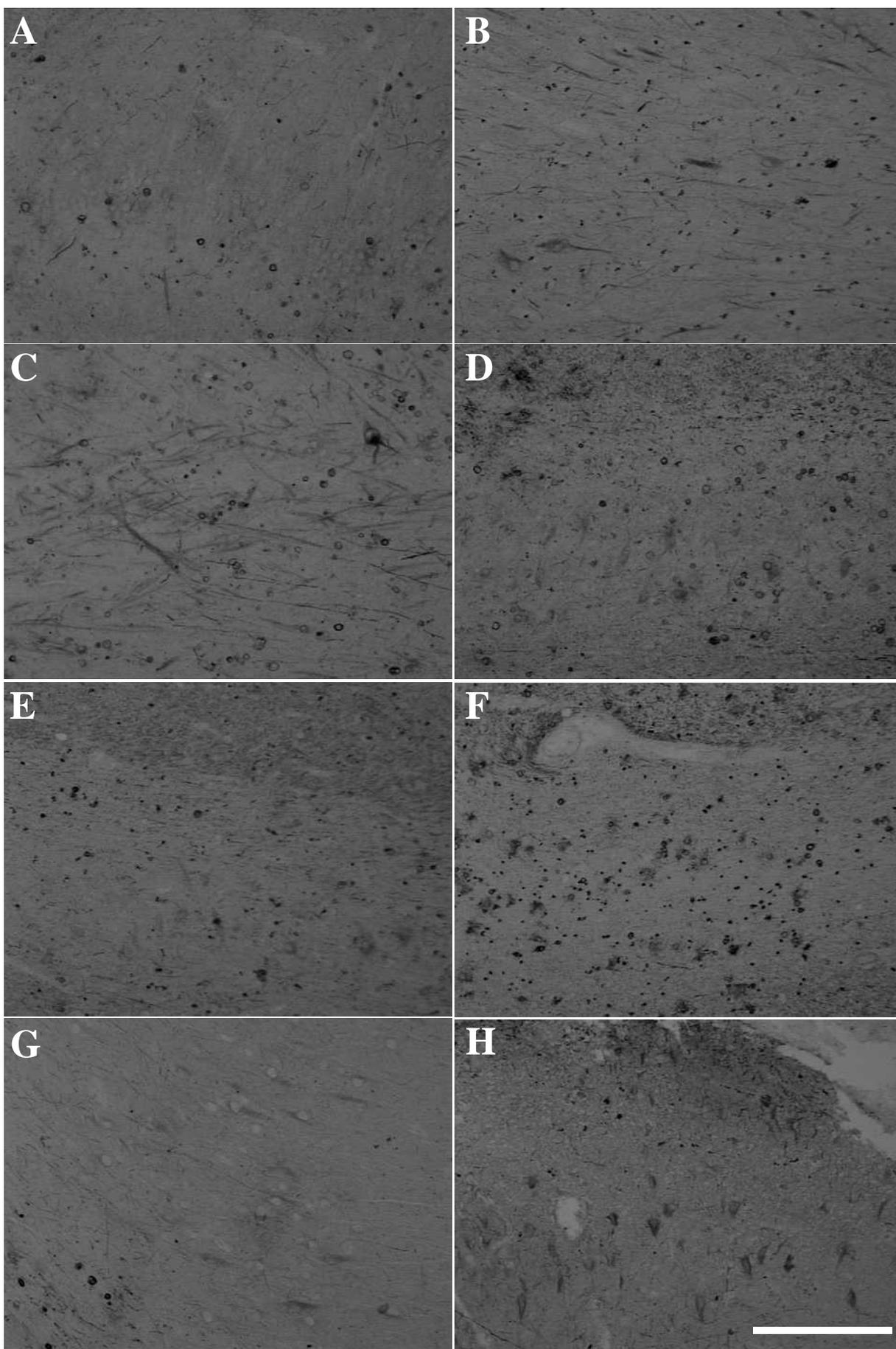
**Figura 49.** Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-CS-56 em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os *outliers* pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



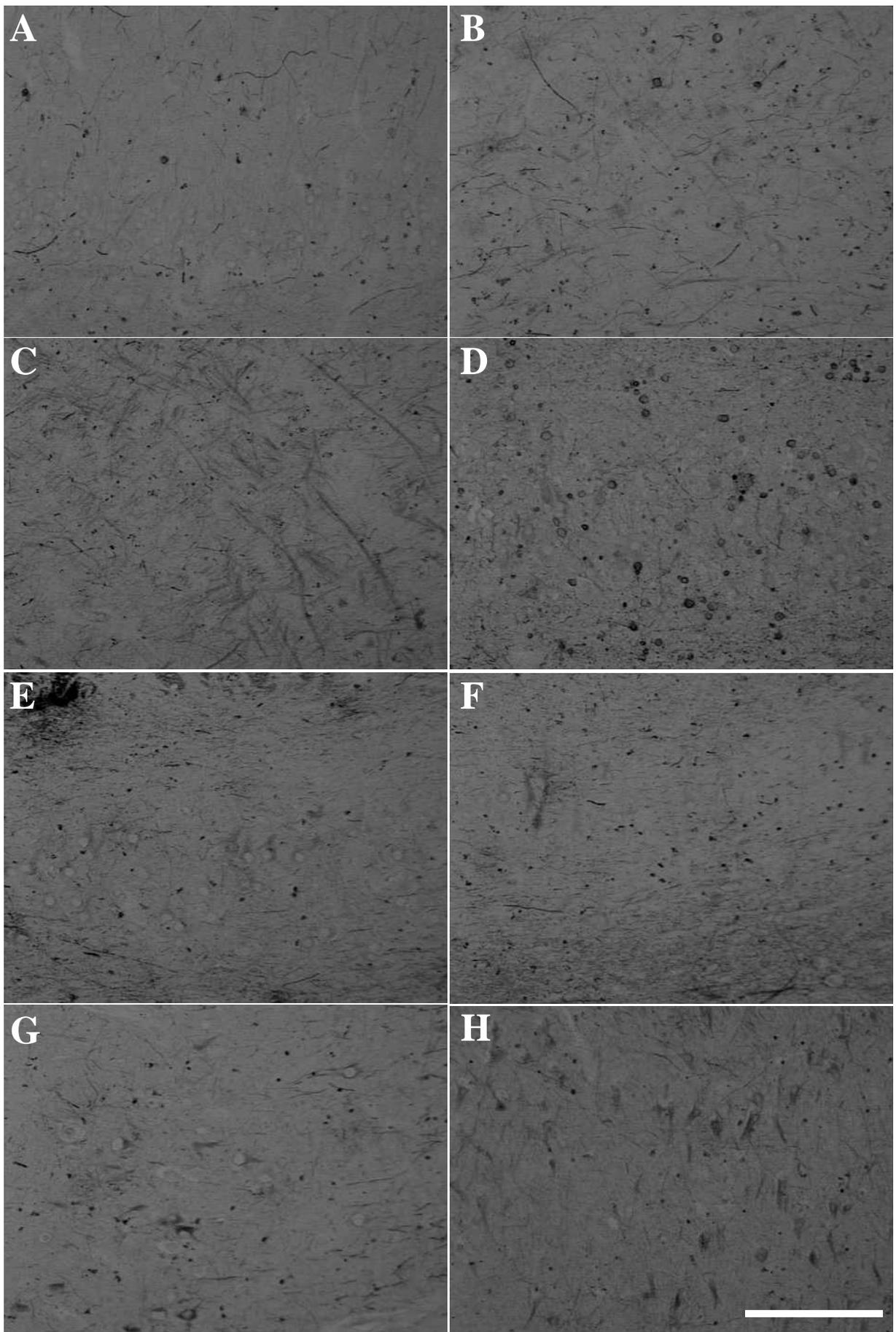
**Figura 50.** Porcentagem de área amostral marcada pelo anticorpo anti-CS-56 em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os outliers pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



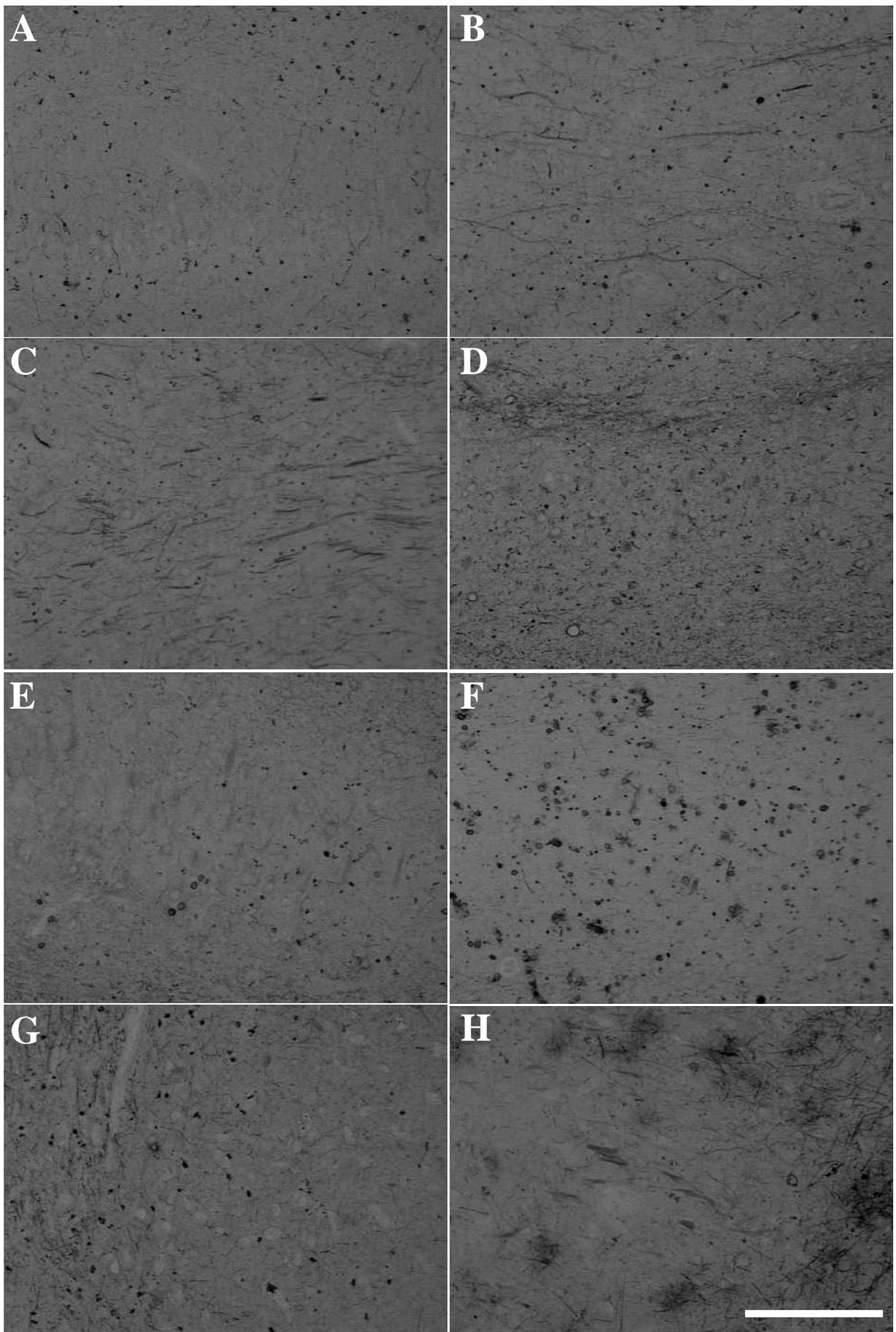
**Figura 51.** Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com anticorpo anti-CS-56 na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbulo (G) e subúbulo (H). A barra em H indica 200µm.



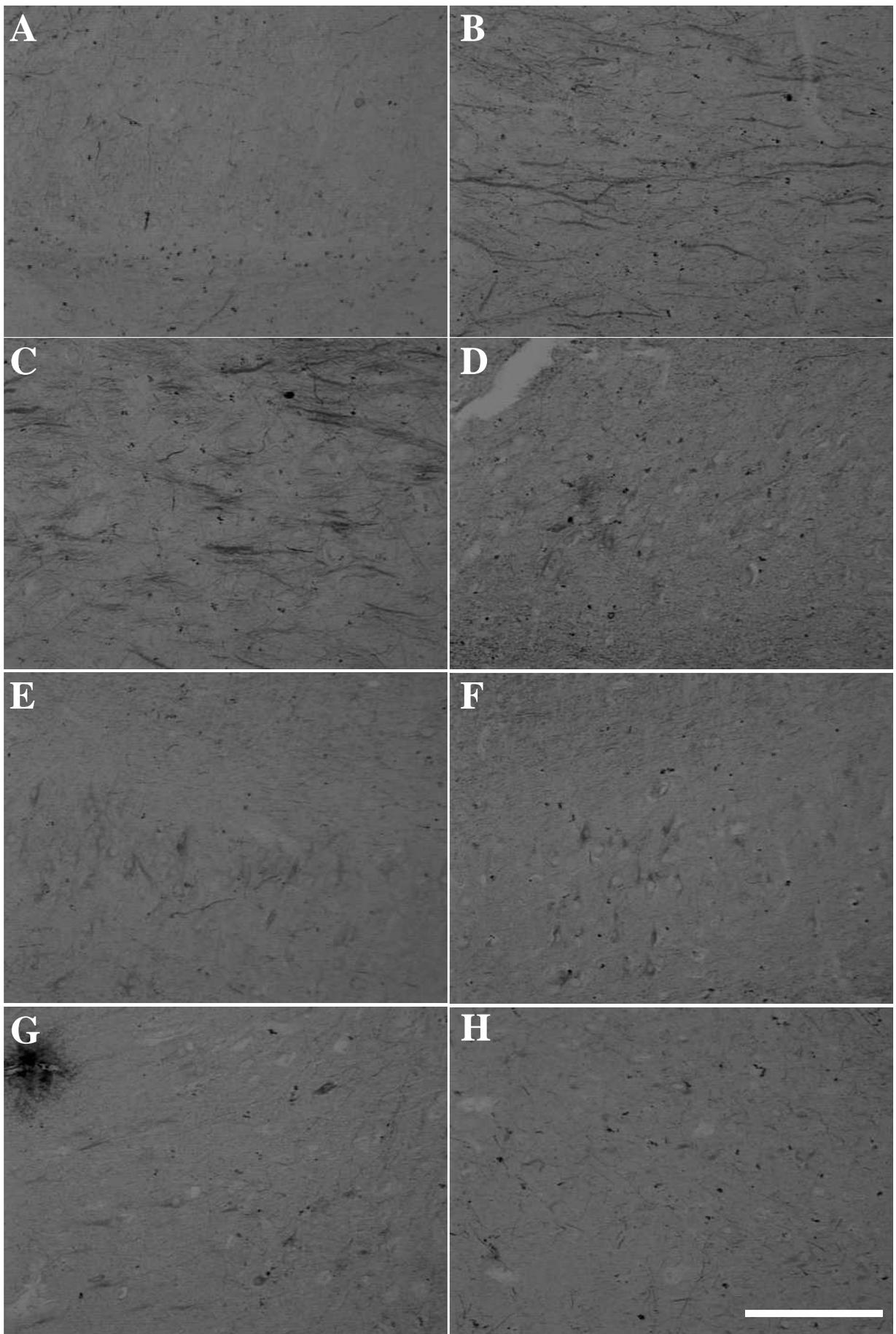
**Figura 52.** Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com anticorpo anti-CS-56 na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbulo (G) e subúbulo (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 53.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com anticorpo anti-CS-56 na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbiculo (G) e subúbiculo (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 54.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com anticorpo anti-CS-56 na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbulo (G) e subúbulo (H). A barra em H indica 200µm.

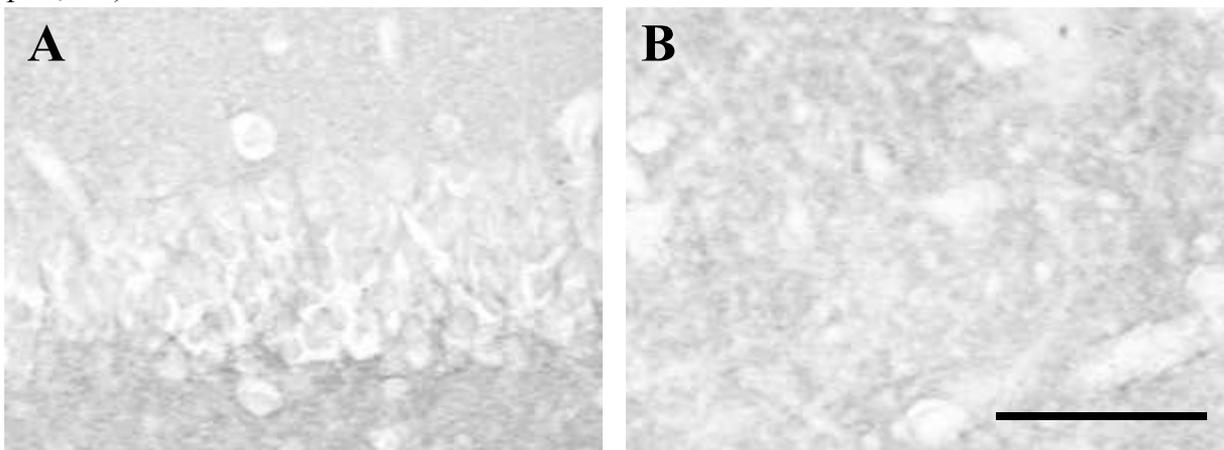


**Figura 55.** Secções hipocâmpais de casos do grupo tumor/displasia marcadas com anticorpo anti-CS-56 na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbulo (G) e subúbulo (H). A barra em H indica 200µm.

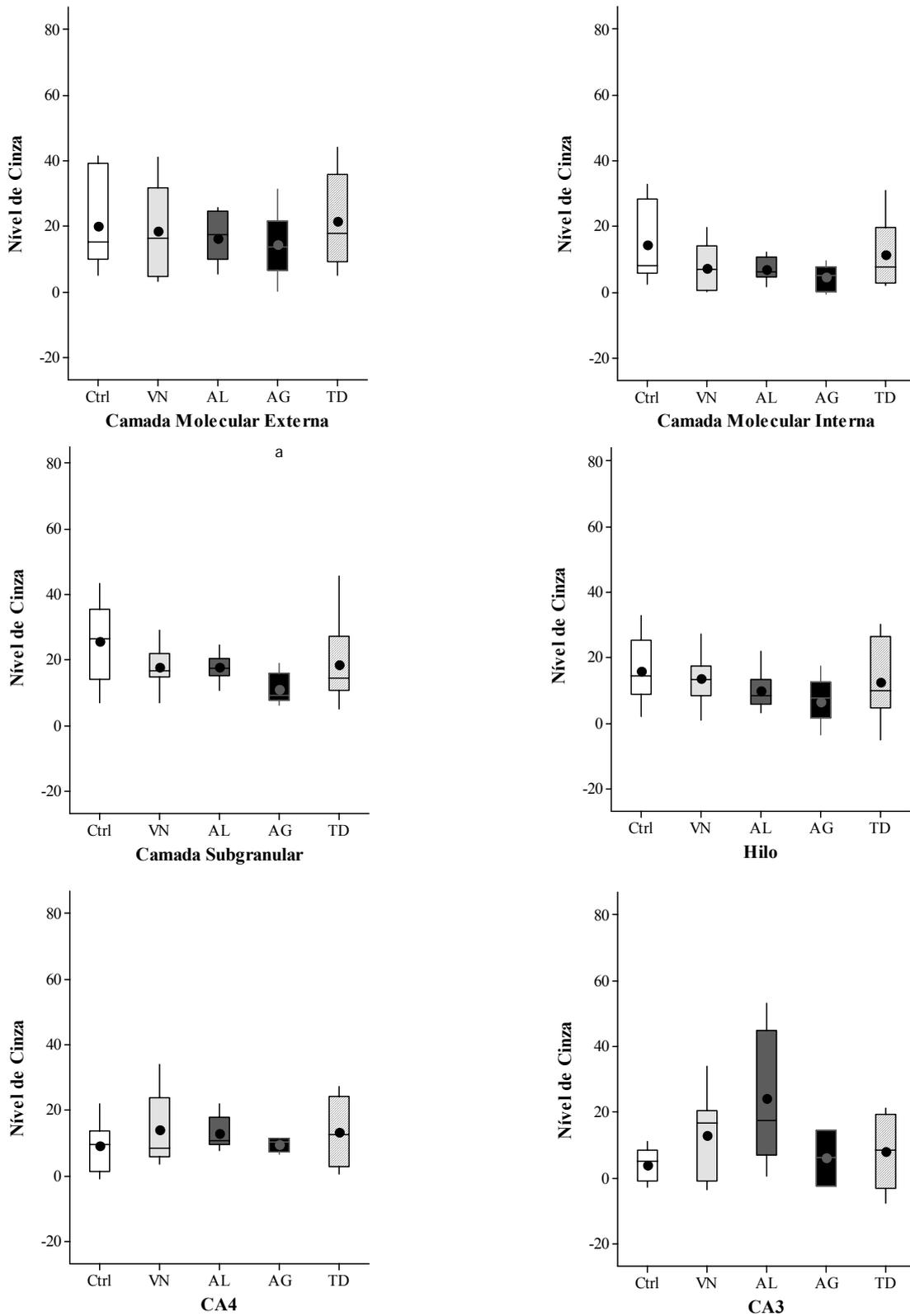
#### 4.9. Ácido Hialurônico

A proteína ligante de ácido hialurônico marcou apenas o meio extracelular, de forma não-homogênea (Figura 56). No hilo, foi freqüentemente observado um padrão com algumas regiões mais escuras e outras mais claras. O nível de cinza foi o mesmo em quase todas as camadas, exceto pela camada granular e subículo, que apresentaram níveis de cinza menores que as demais. Como a camada granular apresentou o menor nível de cinza no grupo Ctrl, o valor desta foi subtraído das demais, caso a caso, visando excluir inespecificidades entre os ensaios histoquímicos.

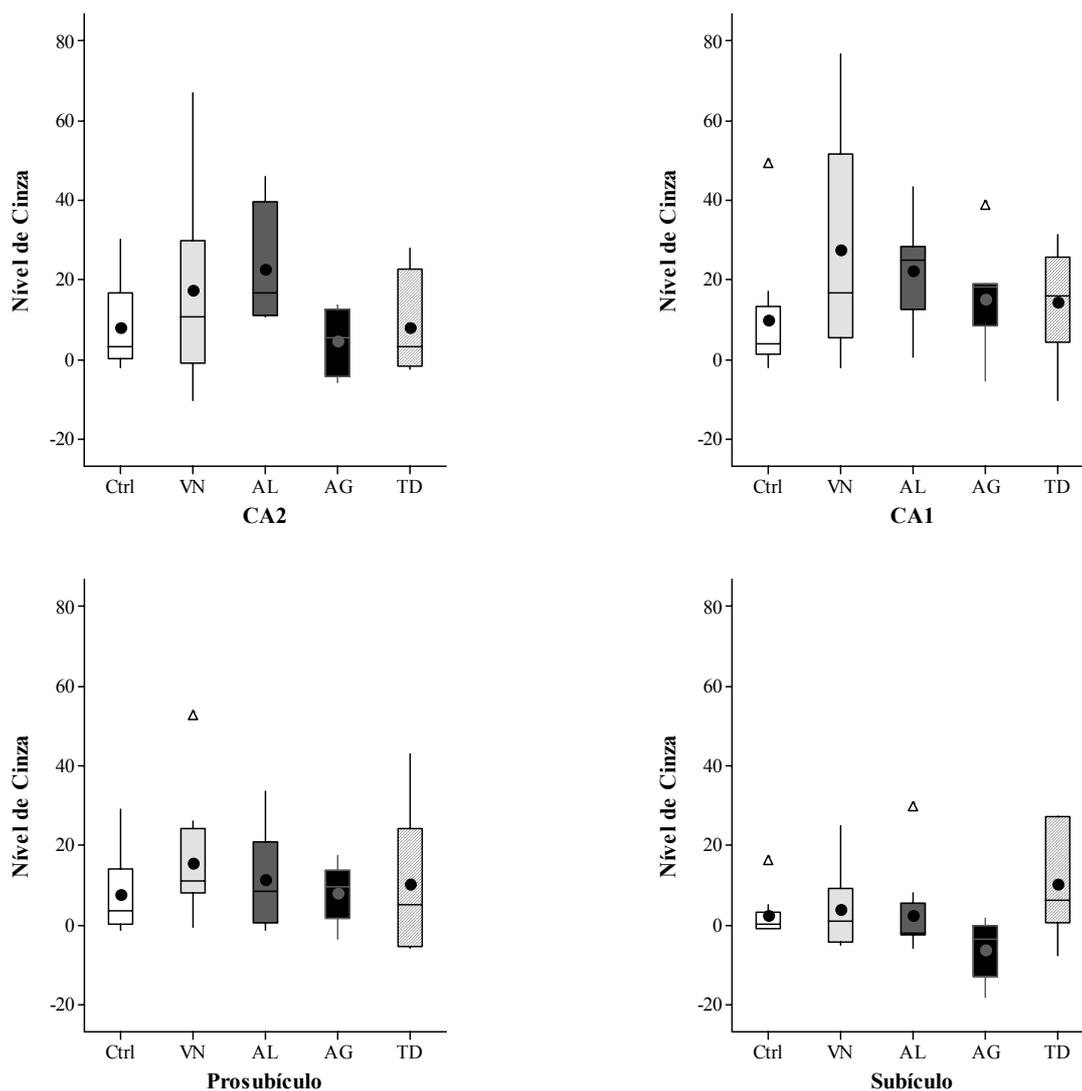
A avaliação do nível de cinza de HABP (Figuras 57-63) revelou redução na camada subgranular do grupo AG em relação ao grupo controle (Ctrl=26±4; VN=18±2; AL=18±1; AG=11±2; TD=19±5; p=0,021). Não foram observadas diferenças entre nenhum grupo na camada molecular externa (Ctrl=20±5, VN=18±4, AL=16±2, AG=17±3, TD=22±5; p=0,863), camada molecular interna (Ctrl=14±4, VN=7±2, AL=7±1, AG=5±1, TD=11±4; p=0,092), hilo (Ctrl=16±3, VN=14±2, AL=10±2, AG=7±3, TD=13±4; p=0,242), CA4 (Ctrl=9±4, VN=14±4, AL=13±2, AG=10±1, TD=13±6; p=0,7), CA3 (Ctrl=4±2, VN=13±5, AL=24±9, AG=6±9, TD=8±5; p=0,086), CA2 (Ctrl=3, VN=11, AL=17, AG=5, TD=3; p=0,395), CA1 (Ctrl=10±5, VN=28±8, AL=22±4, AG=15±5, TD=14±5; p=0,171), prosúbiculo (Ctrl=4, VN=11, AL=8, AG=10, TD=5; p=0,536) e subículo (Ctrl=0, VN=1, AL=-2, AG=-4, TD=6; p=0,056).



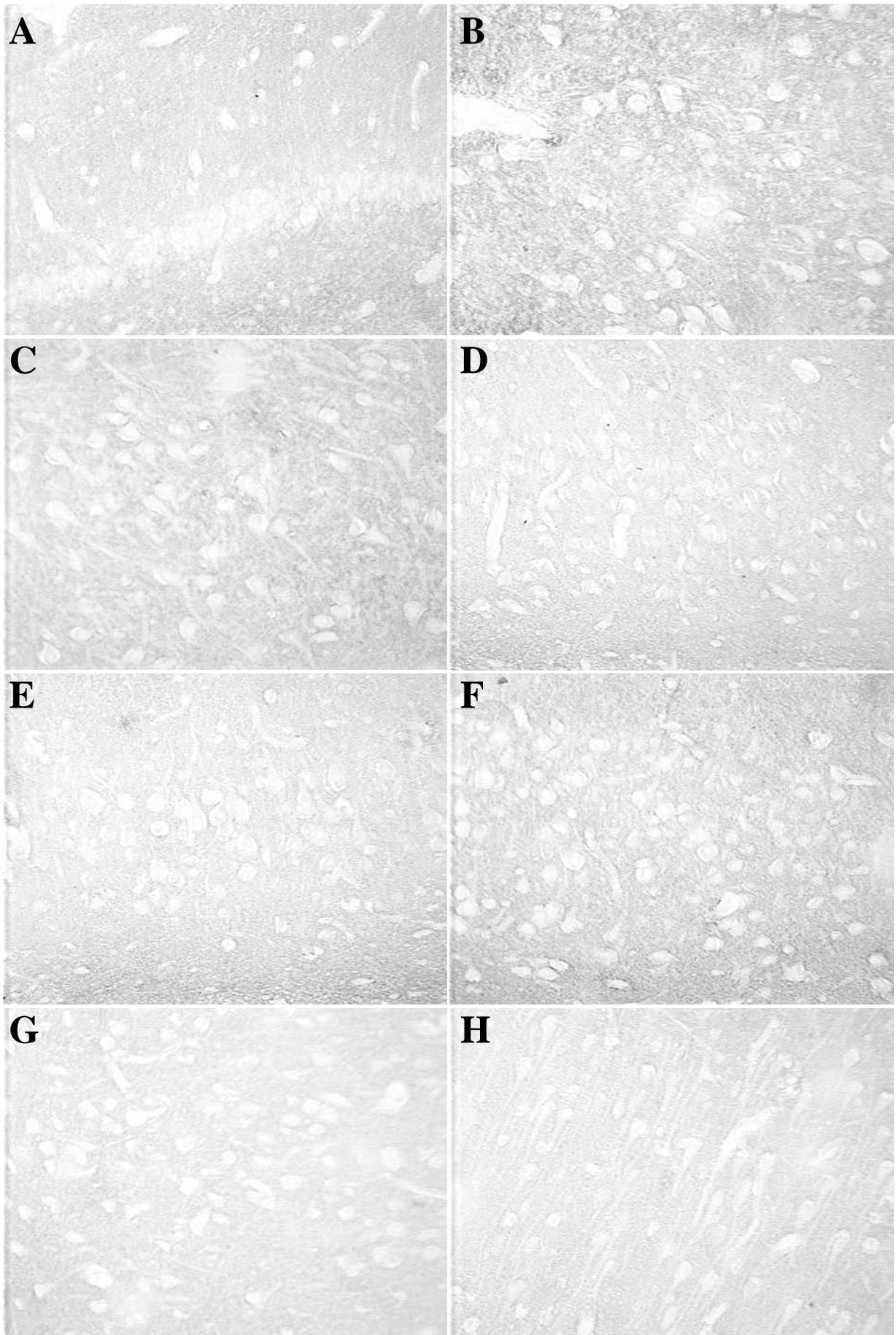
**Figura 56.** Imagens representativas da histoquímica com HABP em secções hipocâmpais de pacientes com ELT. Em A observar o padrão disperso do ácido hialurônico na matriz. Apesar de o padrão de expressão ser disperso, muitas vezes há heterogeneidade, com concentração em alguns pontos dentro de uma região (B). Nas imagens temos fascia dentata (A) e hilo (B). A barra em B indica 100µm e vale para as figuras A-E e em F indica 100µm.



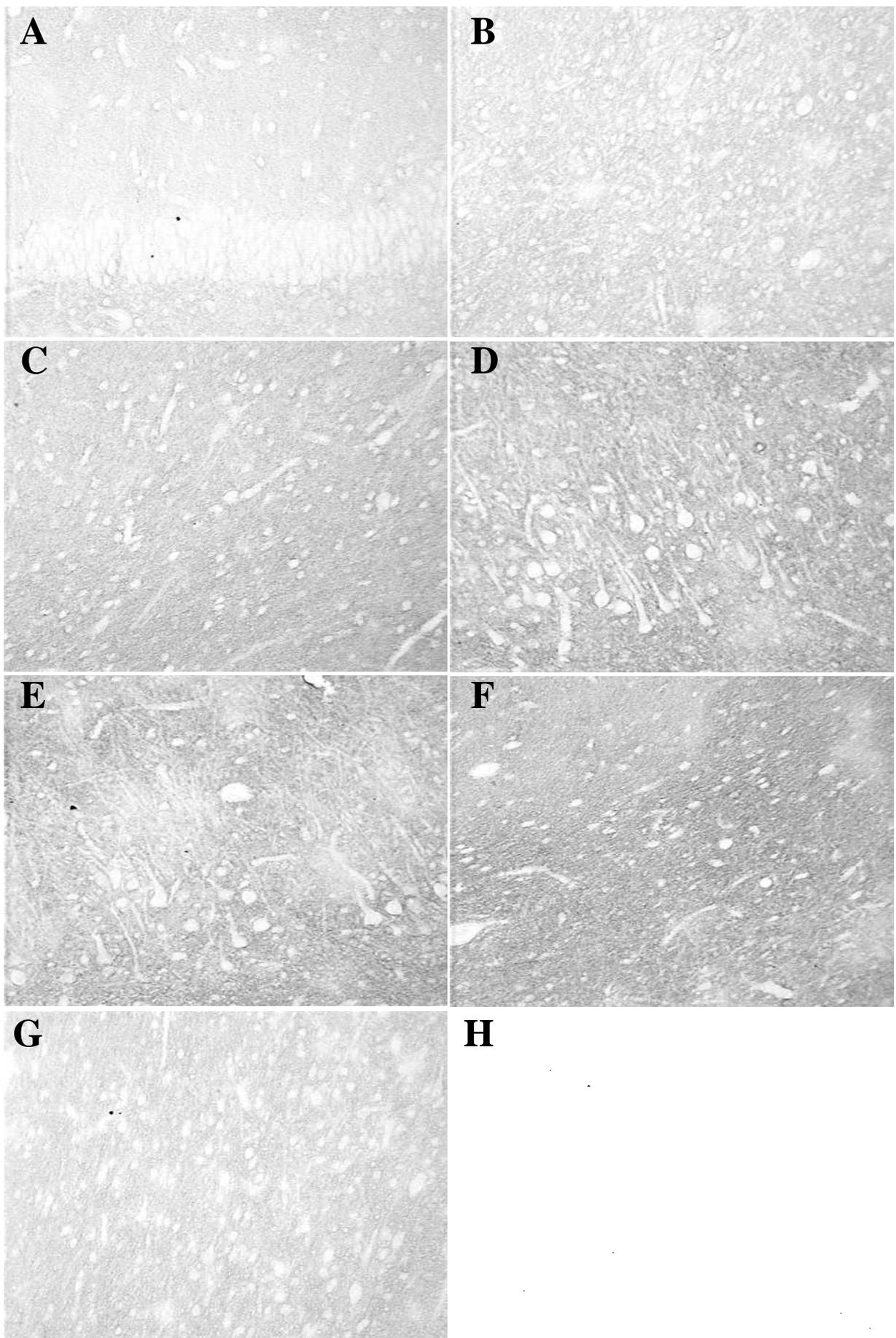
**Figura 57.** Nível de cinza da marcação da proteína HABP em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os outliers pelos triângulos. *a* sobre os Box indica diferença entre o grupo marcado e o grupo Ctrl; *e* indica diferença entre o grupo marcado e o grupo TD.



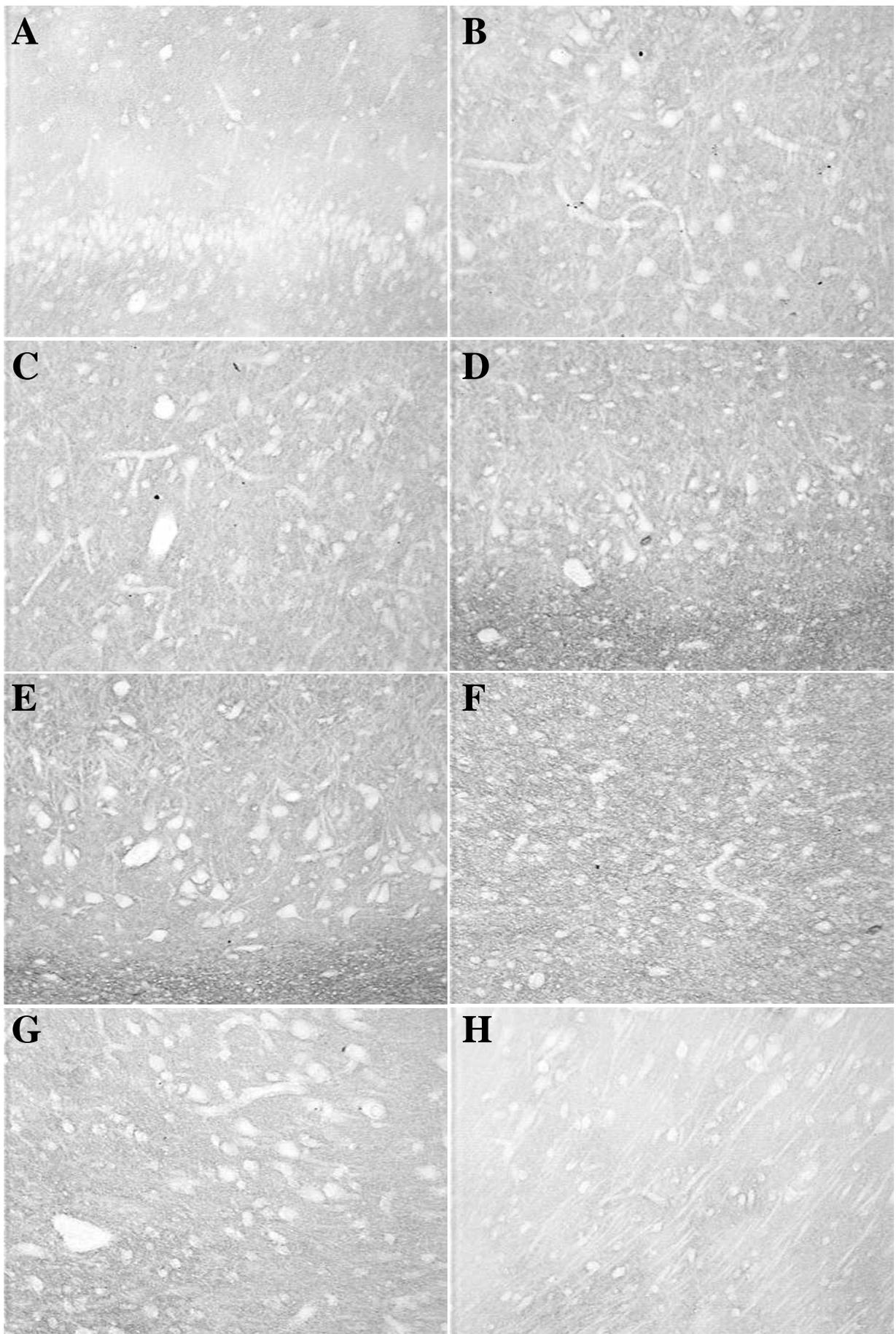
**Figura 58.** Nível de cinza da marcação da proteína HABP em pacientes controle (Ctrl, Box branco) e com ELT e volume hipocampal normal (VN, Box cinza-claro), atrofia hipocampal leve (AL, Box cinza-escuro), atrofia hipocampal grave (AG, Box preto) ou com tumor ou displasia associados à epilepsia (TD, Box hachurado). Médias são indicadas pelos círculos e os outliers pelos triângulos.



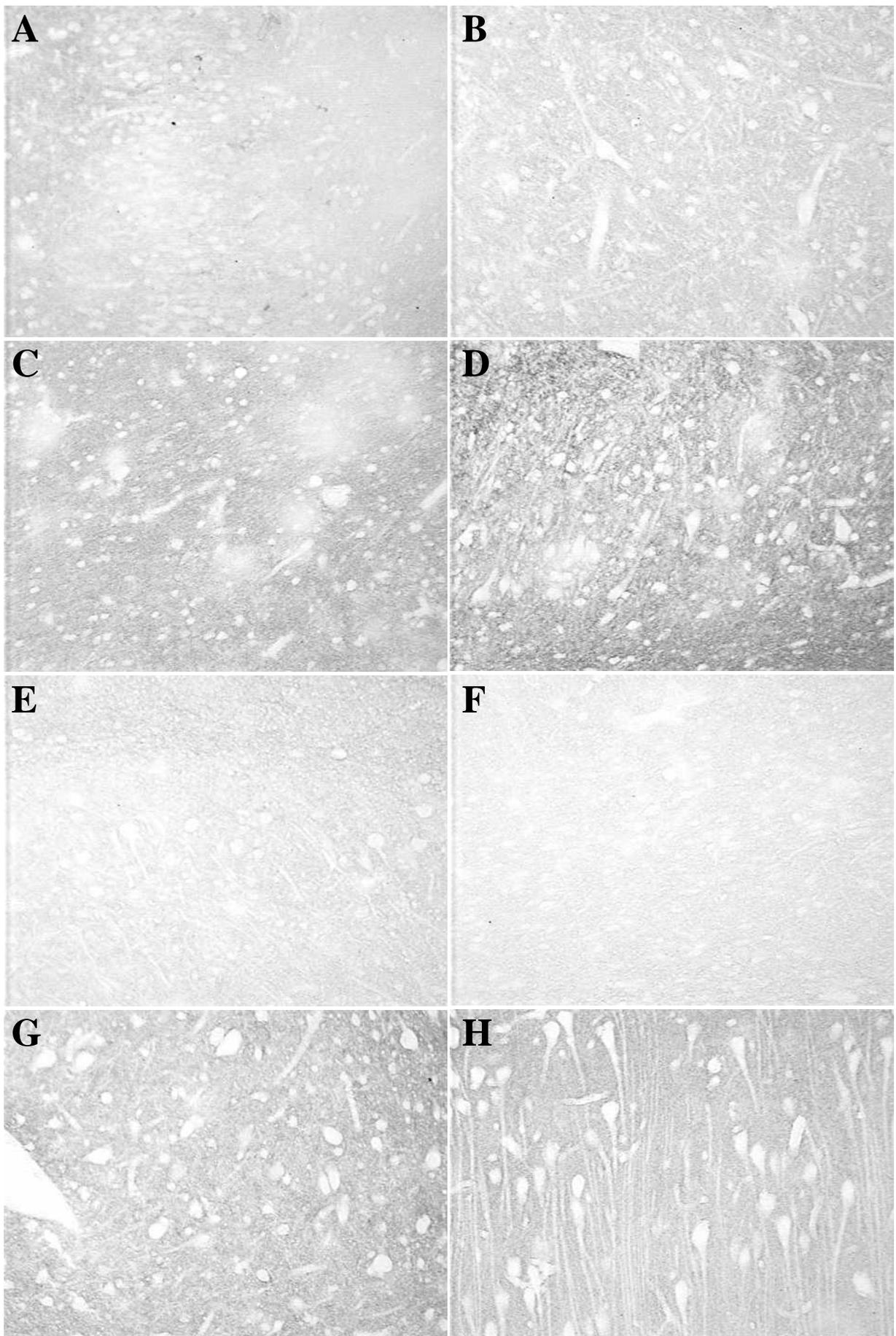
**Figura 59.** Secções hipocâmpais de casos do grupo controle marcadas com HABP na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbulo (G) e subúbulo (H). A barra em H indica 200µm.



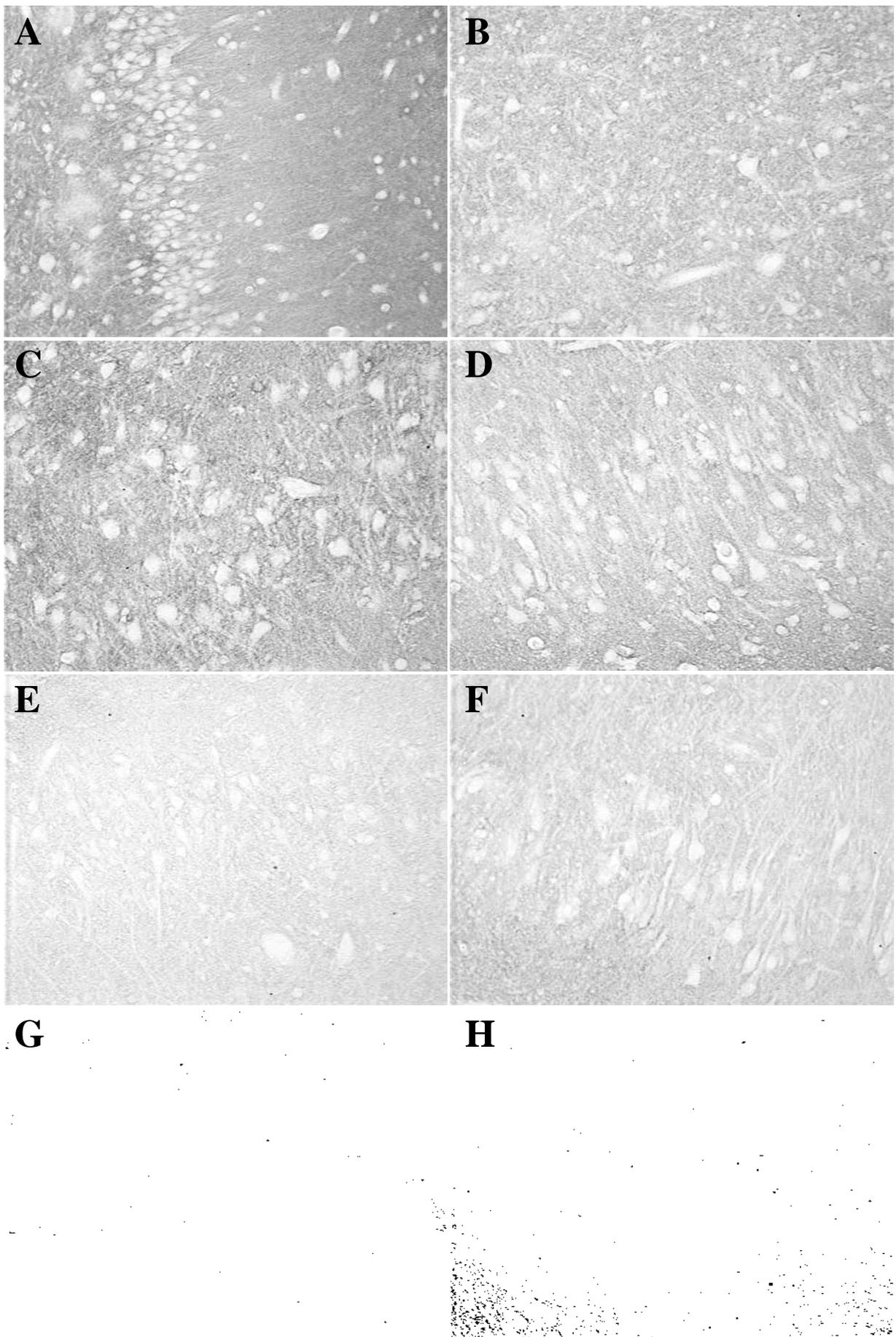
**Figura 60.** Secções hipocâmpais de casos do grupo volume normal marcadas com HABP na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbicula (G) e subúbicula (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 61.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia leve marcadas com HABP na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbiculo (G) e subúbiculo (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 62.** Secções hipocâmpais de casos do grupo atrofia grave marcadas com HABP na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosúbiculo (G) e subúbiculo (H). A barra em H indica 200µm.



**Figura 63.** Secções hipocâmpais de casos do grupo tumor/displasia marcadas com HABP na fascia dentata (A), hilo (B), CA4 (C), CA3 (D), CA2 (E), CA1 (F), prosubículo (G) e subículo (H). A barra em H indica 200µm.

#### **4.10. Correlações**

Visto que não houve diferenças entre os grupos VN, AL e AG, estes grupos foram agrupados em um grupo único (ELTM) para avaliação das correlações entre as variáveis estudadas. Uma exceção foi feita para a avaliação morfométrica, que por ser o grande foco do estudo foi avaliada no agrupamento maior (ELTM) e em cada um dos grupos que o constituiu (i.e., VN, AL e AG).

##### **4.10.1. Morfometria, populações celulares e demais proteínas avaliadas**

*Grupo ELTM:* observaram-se correlações positivas entre o volume total do hipocampo ipsilateral e densidade neuronal ( $r=0,405$ ,  $p=0,000673$ ,  $n=67$ ) e a área amostral imunopositiva pelo anticorpo anti-NeuN ( $r=0,451$ ,  $p=0,000126$ ,  $n=67$ ) na região CA1. Em relação à área hipocampal média vista na RNM, tanto total como apenas do corpo hipocampal, não houve correlação entre esta e a densidade neuronal ou a área marcada por NeuN. Não houve correlações significativas entre a área da secção e a densidade ou área marcada por NeuN no grupo ELTM.

O volume do corpo do hipocampo ipsilateral correlacionou-se positivamente com o nível de cinza de HABP no prosúbulo ( $r=0,501$ ;  $p=0,04$ ;  $n=17$ ). A área total do hipocampo correlacionou-se positivamente com os níveis de cinza de HABP na camada subgranular ( $r=0,587$ ;  $p=0,00646$ ;  $n=20$ ). A área do corpo hipocampal correlacionou-se positivamente com o nível de cinza na camada subgranular ( $r=0,545$ ;  $p=0,0128$ ;  $n=20$ ), hilo ( $r=0,462$ ;  $p=0,0459$ ;  $n=19$ ) e prosúbulo ( $r=0,547$ ;  $p=0,0228$ ;  $n=17$ ).

Não foram observadas correlações entre os parâmetros morfométricos e as áreas imunopositivas para GFAP, MT, AQP4, HLA-DR e CS.

*Grupo VN:* houve correlação positiva entre o índice de atrofia e a densidade neuronal na camada granular ( $r=0,442$ ;  $p=0,0306$ ;  $n=24$ ) e negativa entre o índice de atrofia e a área imunopositiva para NeuN no subúbulo ( $r=-0,53$ ;  $p=0,0136$ ;  $n=21$ ). A densidade neuronal em CA2 correlacionou-se positivamente com o volume do hipocampo ipsilateral ( $r=0,432$ ;  $p=0,0443$ ;  $n=22$ ).

A área imunopositiva para GFAP correlacionou-se negativamente em CA1 com o índice de atrofia ( $r=-0,426$ ;  $p=0,0377$ ;  $n=24$ ), positivamente na camada molecular interna com

o volume do hipocampo ipsilateral ( $r=0,415$ ;  $p=0,0436$ ;  $n=24$ ) e no prosúbulo com a área do corpo do hipocampo ipsilateral ( $r=0,549$ ;  $p=0,049$ ;  $n=13$ ).

A área imunopositiva para HLA-DR correlacionou-se negativamente com o índice de atrofia em CA2 ( $r=-0,594$ ;  $p=0,0149$ ;  $n=16$ ), CA1 ( $r=-0,501$ ;  $p=0,0244$ ;  $n=20$ ) e no prosúbulo ( $r=-0,673$ ;  $p=0,029$ ;  $n=10$ ). A área do corpo do hipocampo ipsilateral correlacionou-se negativamente com a área de HLA-DR no subículo ( $r=-0,7$ ;  $p=0,0301$ ;  $n=9$ ) e a área do hipocampo ipsilateral correlacionou-se negativamente com a área de HLA-DR no hilo ( $r=-0,574$ ;  $p=0,0306$ ;  $n=14$ ).

Houve correlação negativa entre o volume do hipocampo ipsilateral e a área imunopositiva para CS-56 no prosúbulo ( $r=-0,529$ ;  $p=0,0283$ ;  $n=17$ ) e no subículo ( $r=-0,509$ ;  $p=0,0358$ ;  $n=17$ ) e entre o volume do corpo do hipocampo ipsilateral e a área imunopositiva para CS-56 no subículo ( $r=-0,648$ ;  $p=0,0377$ ;  $n=10$ ).

O índice de atrofia correlacionou-se negativamente com o nível de cinza de HABP em CA1 ( $r=-0,7$ ;  $p=0,0145$ ;  $n=11$ ). O volume do hipocampo ipsilateral correlacionou-se negativamente com o nível de cinza de HABP em CA2 ( $r=-0,786$ ;  $p=0,0149$ ;  $n=8$ ). Houve correlação positiva entre a área do hipocampo ipsilateral e o nível de cinza de HABP na camada subgranular ( $r=0,821$ ;  $p=0,0145$ ;  $n=7$ ).

Não houve correlações entre a morfometria e as áreas imunopositivas para MT e AQP4.

*Grupo AL:* observou-se correlação negativa entre o volume do corpo do hipocampo ipsilateral e a densidade neuronal ( $r=-0,715$ ;  $p=0$ ;  $n=20$ ) e área imunopositiva para NeuN ( $r=-0,445$ ;  $p=0,0485$ ;  $n=20$ ) na camada granular. Houve correlação positiva entre a densidade neuronal em CA4 e o índice de atrofia ( $r=0,568$ ;  $p=0,0111$ ;  $n=19$ ). A área imunopositiva para NeuN na camada granular correlacionou-se positivamente com a área do hipocampo ipsilateral ( $r=0,546$ ;  $p=0,0128$ ;  $n=20$ ).

O volume do hipocampo ipsilateral correlacionou-se positivamente com a área imunopositiva para GFAP em CA3 ( $r=0,549$ ;  $p=0,049$ ;  $n=13$ ) e a área do corpo do hipocampo ipsilateral correlacionou-se com a área de GFAP em CA1 ( $r=0,48$ ;  $p=0,032$ ;  $n=20$ ).

Houve correlação negativa entre o índice de atrofia e a área imunopositiva para MT em CA2 ( $r=-0,697$ ;  $p=0,00507$ ;  $n=14$ ) e no prosúbulo ( $r=-0,451$ ;  $p=0,0399$ ;  $n=21$ ) e positiva entre o volume do corpo do hipocampo ipsilateral e a área de MT em CA3 ( $r=0,629$ ;  $p=0,0263$ ;  $n=12$ ).

A área do hipocampo ipsilateral correlacionou-se positivamente com as áreas imunopositivas para AQP4 em CA4 ( $r=0,733$ ;  $p=0,0131$ ;  $n=10$ ) e CA3 ( $r=0,762$ ;  $p=0,0212$ ;  $n=8$ ).

Observaram-se correlações positivas entre o volume do hipocampo ipsilateral e as áreas imunopositivas para HLA-DR na camada subgranular ( $r=0,455$ ;  $p=0,0381$ ;  $n=21$ ), hilo ( $r=0,589$ ;  $p=0,00792$ ;  $n=19$ ), CA4 ( $r=0,646$ ;  $p=0,00882$ ;  $n=15$ ) e CA3 ( $r=0,685$ ;  $p=0,0252$ ;  $n=10$ ).

A área imunopositiva para CS-56 em CA3 correlacionou-se positivamente com a área do corpo do hipocampo ipsilateral ( $r=0,75$ ;  $p=0,0158$ ;  $n=9$ ).

O nível de cinza de HABP no subículo correlacionou-se negativamente com o índice de atrofia ( $r=-0,615$ ;  $p=0,0389$ ;  $n=11$ ). A área do corpo do hipocampo ipsilateral correlacionou-se positivamente com os níveis de cinza de HABP na camada subgranular ( $r=0,705$ ;  $p=0,0186$ ;  $n=10$ ) e hilo ( $r=0,787$ ;  $p=0,00897$ ;  $n=9$ ).

*Grupo AG:* observaram-se correlações negativas entre o volume do corpo do hipocampo ipsilateral e a densidade neuronal no prosúbulo ( $r=-0,681$ ;  $p=0,0252$ ;  $n=10$ ), entre o volume do hipocampo ipsilateral e a densidade neuronal em CA1 ( $r=-0,451$ ;  $p=0,0452$ ;  $n=20$ ) e entre a área do hipocampo ipsilateral e a densidade neuronal ( $r=-0,782$ ;  $p=0,00523$ ;  $n=10$ ) e área imunopositiva para NeuN ( $r=-0,636$ ;  $p=0,0427$ ;  $n=10$ ) no subículo.

Houve correlação positiva entre a área de GFAP em CA2 e a área do hipocampo ipsilateral ( $r=0,673$ ;  $p=0,029$ ;  $n=10$ ).

Observaram-se correlações negativas entre a área de AQP4 na camada molecular interna e a área do corpo ( $r=-0,587$ ;  $p=0,0416$ ;  $n=12$ ) e total ( $r=-0,706$ ;  $p=0,00903$ ;  $n=12$ ) do hipocampo ipsilateral. O índice de atrofia correlacionou-se negativamente com a área imunopositiva para AQP4 na camada granular ( $r=-0,46$ ;  $p=0,0407$ ;  $n=20$ ) e em CA3 ( $r=-0,608$ ;  $p=0,0333$ ;  $n=12$ ). A área imunopositiva na camada subgranular correlacionou-se

negativamente com o volume ( $r=-0,597$ ;  $p=0,00551$ ;  $n=20$ ) e a área ( $r=-0,615$ ;  $p=0,0308$ ;  $n=12$ ) do hipocampo ipsilateral.

A área imunopositiva para HLA-DR em CA2 correlacionou-se positivamente com o índice de atrofia ( $r=0,657$ ;  $p=0,0186$ ;  $n=12$ ).

Houve correlação negativa entre a área de CS-56 na camada subgranular e o volume do hipocampo ipsilateral ( $r=-0,485$ ;  $p=0,0471$ ;  $n=17$ ) e positiva entre a área de CS-56 em CA1 e o volume do corpo do hipocampo ipsilateral ( $r=0,673$ ;  $p=0,029$ ;  $n=10$ ).

Não houve correlação entre o nível de cinza de HABP e as características morfométricas.

#### **4.10.2. Populações celulares**

*Grupo Ctrl:* Observaram-se correlações negativas entre a densidade neuronal em CA4 e a área de GFAP em CA2 ( $r=-0,678$ ;  $p=0,0361$ ;  $n=9$ ) e entre a área de NeuN no subículo e a área de GFAP no prosubículo ( $r=-0,731$ ;  $p=0,0287$ ;  $n=8$ ) e positivas entre densidade neuronal no prosubículo e as áreas imunopositivas para GFAP em CA1 ( $r=0,829$ ;  $p=0,0145$ ;  $n=7$ ) e no subículo ( $r=0,928$ ;  $p=0,0167$ ;  $n=6$ ) e entre a área de NeuN em CA4 e as áreas de GFAP na camada molecular interna ( $r=0,817$ ;  $p=0,00393$ ;  $n=9$ ) e no subículo ( $r=0,678$ ;  $p=0,0361$ ;  $n=9$ ).

Observaram-se correlações positivas entre a densidade neuronal em CA2 e a área de HLA-DR no subículo ( $r=0,762$ ;  $p=0,0121$ ;  $n=9$ ) e entre a densidade neuronal no subículo e a área de HLA-DR na camada molecular interna ( $r=0,84$ ;  $p=0,00199$ ;  $n=9$ ), camada granular ( $r=0,723$ ;  $p=0,0248$ ;  $n=9$ ) e CA1 ( $r=0,672$ ;  $p=0,0428$ ;  $n=9$ ). A área imunopositiva para NeuN em CA3 correlacionou-se positivamente com a área de HLA-DR na camada subgranular ( $r=0,667$ ;  $p=0,0428$ ;  $n=9$ ).

A área imunopositiva para HLA-DR em CA4 correlacionou-se positivamente com a área de GFAP no hilo ( $r=0,574$ ;  $p=0,0158$ ;  $n=17$ ). Observaram-se correlações positivas entre a área de HLA-DR em CA3 e as áreas de GFAP na camada molecular externa ( $r=0,59$ ;  $p=0,0124$ ;  $n=17$ ), camada molecular interna ( $r=0,587$ ;  $p=0,0128$ ;  $n=17$ ), camada granular ( $r=0,53$ ;  $p=0,0283$ ;  $n=17$ ), camada subgranular ( $r=0,668$ ;  $p=0,00313$ ;  $n=17$ ), hilo ( $r=0,58$ ;  $p=0,0182$ ;  $n=16$ ) e CA4 ( $r=0,492$ ;  $p=0,0434$ ;  $n=17$ ). A área de GFAP no hilo correlacionou-se

positivamente com a área de HLA-DR em CA2 ( $r=0,617$ ;  $p=0,0105$ ;  $n=16$ ). A área imunopositiva para HLA-DR no prosúbulo correlacionou-se com as áreas de GFAP na camada molecular externa ( $r=0,689$ ;  $p=0,00292$ ;  $n=16$ ), camada molecular interna ( $r=0,614$ ;  $p=0,011$ ;  $n=16$ ), hilo ( $r=0,633$ ;  $p=0,00834$ ;  $n=16$ ) e CA2 ( $r=0,577$ ;  $p=0,0231$ ;  $n=15$ ).

*Grupo ELTM:* Observamos correlação negativa entre a área imunopositiva para GFAP em CA1 e a densidade neuronal na camada granular ( $r=-0,408$ ,  $p=0,000668$ ,  $n=66$ ) e em CA1 ( $r=-0,586$ ,  $p=0,000000239$ ,  $n=66$ ). Na região CA1, houve correlação entre a área de NeuN e a área de GFAP ( $r=-0,595$ ,  $p=0,000000136$ ,  $n=66$ ).

Observaram-se correlações negativas entre a área de HLA-DR em CA2 e as áreas de NeuN na camada granular ( $r=-0,55$ ;  $p=0,000287$ ;  $n=39$ ), CA4 ( $r=-0,453$ ;  $p=0,00431$ ;  $n=38$ ) e CA3 ( $r=-0,438$ ;  $p=0,00962$ ;  $n=34$ ) e entre a área de HLA-DR no hilo e a área de NeuN no subúbulo ( $r=-0,418$ ;  $p=0,00168$ ;  $n=54$ ).

Observou-se correlação entre as áreas de GFAP e HLA-DR em CA3 ( $r=0,536$ ;  $p=0,000523$ ;  $n=38$ )

*Grupo TD:* A densidade neuronal da região granular correlacionou-se negativamente com as áreas imunopositivas para GFAP em CA1 ( $r=-0,589$ ,  $p=0,0063$ ,  $n=20$ ) e no prosúbulo ( $r=-0,748$ ,  $p=0$ ,  $n=17$ ). A densidade da região CA4 correlacionou-se negativamente com a área de GFAP no prosúbulo ( $r=-0,747$ ,  $p=0$ ,  $n=16$ ). Houve correlação negativa entre a densidade neuronal em CA2 e a área de GFAP em CA3 ( $r=-0,515$ ,  $p=0,048$ ,  $n=15$ ) e CA1 ( $r=-0,637$ ,  $p=0,00794$ ,  $n=16$ ). A densidade em CA1 correlacionou-se negativamente com a área imunopositiva para GFAP nas camadas molecular externa ( $r=-0,464$ ,  $p=0,045$ ,  $n=19$ ), molecular interna ( $r=-0,478$ ,  $p=0,0382$ ,  $n=19$ ) e granular ( $r=-0,563$ ,  $p=0,012$ ,  $n=19$ ). Observamos correlações negativas entre a densidade neuronal no prosúbulo e a área de GFAP em CA3 ( $r=-0,627$ ,  $p=0,0158$ ,  $n=14$ ), CA2 ( $r=-0,645$ ,  $p=0,00882$ ,  $n=15$ ) e CA1 ( $r=-0,495$ ,  $p=0,0423$ ,  $n=17$ ). Houve correlação negativa entre a densidade neuronal no subúbulo e a área de GFAP em CA3 ( $r=-0,648$ ,  $p=0,0115$ ,  $n=14$ ) e CA2 ( $r=-0,704$ ,  $p=0,00302$ ,  $n=15$ ). A área imunopositiva para NeuN na camada granular correlacionou-se negativamente com a área de GFAP no prosúbulo ( $r=-0,566$ ,  $p=0,0175$ ,  $n=17$ ). Observamos correlação negativa entre a área de NeuN em CA3 e a área de GFAP em CA2 ( $r=-0,632$ ,  $p=0,011$ ,  $n=15$ ).

A área de NeuN no subículo correlacionou-se com a área de GFAP em CA4 ( $r=-0,509$ ,  $p=0,0428$ ,  $n=16$ ).

Observou-se correlação positiva entre área de NeuN no prosúbulo e área de HLA-DR em CA4 ( $r=0,539$ ;  $p=0,0367$ ;  $n=15$ ).

A área imunopositiva para GFAP na camada granular correlacionou-se negativamente com as áreas de HLA-DR na camada molecular externa ( $r=-0,493$ ;  $p=0,0316$ ;  $n=19$ ), camada granular ( $r=-0,472$ ;  $p=0,0407$ ;  $n=19$ ), CA2 ( $r=-0,562$ ;  $p=0,023$ ;  $n=16$ ) e CA1 ( $r=-0,458$ ;  $p=0,0478$ ;  $n=19$ ). A área de GFAP na camada subgranular correlacionou-se negativamente com as áreas de HLA-DR na camada molecular externa ( $r=-0,511$ ;  $p=0,0253$ ;  $n=19$ ) e CA2 ( $r=-0,509$ ;  $p=0,0428$ ;  $n=16$ ). Observaram-se correlações negativas entre a área de GFAP no hilo e as áreas de HLA-DR na camada molecular externa ( $r=-0,549$ ;  $p=0,0149$ ;  $n=19$ ), camada granular ( $r=-0,489$ ;  $p=0,033$ ;  $n=19$ ) e CA2 ( $r=-0,556$ ;  $p=0,0247$ ;  $n=16$ ). A área de GFAP em CA2 correlacionou-se positivamente com a área de HLA-DR em CA1 ( $r=0,646$ ;  $p=0,00882$ ;  $n=15$ ). A área imunopositiva para GFAP em CA1 correlacionou-se positivamente com as áreas imunopositivas para HLA-DR em CA1 ( $r=0,542$ ;  $p=0,0164$ ;  $n=19$ ) e no prosúbulo ( $r=0,623$ ;  $p=0,0167$ ;  $n=14$ ). Houve correlação positiva entre a área de GFAP no prosúbulo e a área de HLA-DR na camada molecular interna ( $r=0,519$ ;  $p=0,0376$ ;  $n=16$ ).

#### ***4.10.3. Metalotioneínas I/II e populações celulares***

*Grupo Ctrl:* Observaram-se correlações positivas entre a densidade neuronal em CA4 e as áreas de MT em CA1 ( $r=0,712$ ;  $p=0,0248$ ;  $n=9$ ) e no prosúbulo ( $r=0,83$ ;  $p=0,00526$ ;  $n=8$ ) e entre a área imunopositiva para NeuN em CA2 e as áreas de MT na camada granular ( $r=0,667$ ;  $p=0,0428$ ;  $n=9$ ), no hilo ( $r=0,81$ ;  $p=0,0096$ ;  $n=8$ ) e no subículo ( $r=0,8$ ;  $p=0,00625$ ;  $n=9$ ). A densidade neuronal em CA1 correlacionou-se negativamente com a área de MT no subículo ( $r=-0,781$ ;  $p=0,0149$ ;  $n=8$ ).

Não houve correlação entre as áreas de GFAP e HLA-DR com as áreas de MT.

*Grupo ELTM:* Não foram observadas correlações entre a área de MT e as áreas de GFAP, HLA-DR, NeuN ou a densidade neuronal neste grupo.

*Grupo TD:* Observou-se correlação positiva entre a densidade neuronal em CA3 e a área imunopositiva para MT na camada molecular externa ( $r=0,55$ ,  $p=0,0325$ ,  $n=15$ ), no hilo ( $r=0,531$ ,  $p=0,034$ ,  $n=16$ ), em CA4 ( $r=0,507$ ,  $p=0,0442$ ,  $n=16$ ), CA2 ( $r=0,516$ ,  $p=0,048$ ,  $n=15$ ), CA1 ( $r=0,562$ ,  $p=0,023$ ,  $n=16$ ) e no prosúbulo ( $r=0,547$ ,  $p=0,0339$ ,  $n=15$ ). A área imunopositiva para NeuN em CA4 correlacionou-se positivamente com as áreas de MT na camada molecular externa ( $r=0,505$ ,  $p=0,0378$ ,  $n=17$ ), granular ( $r=0,618$ ,  $p=0,00811$ ,  $n=17$ ), subgranular ( $r=0,706$ ,  $p=0,0013$ ,  $n=17$ ), hilo ( $r=0,641$ ,  $p=0,00408$ ,  $n=18$ ), CA4 ( $r=0,6$ ,  $p=0,0107$ ,  $n=17$ ), CA3 ( $r=0,638$ ,  $p=0,00756$ ,  $n=16$ ), CA2 ( $r=0,543$ ,  $p=0,0353$ ,  $n=15$ ), CA1 ( $r=0,488$ ,  $p=0,0391$ ,  $n=18$ ) e no prosúbulo ( $r=0,538$ ,  $p=0,0449$ ,  $n=14$ ). Houve correlação positiva entre a área de NeuN em CA3 e a área de MT nas camadas molecular externa ( $r=0,586$ ,  $p=0,0211$ ,  $n=15$ ), molecular interna ( $r=0,65$ ,  $p=0,00832$ ,  $n=15$ ), granular ( $r=0,614$ ,  $p=0,0143$ ,  $n=15$ ) e subgranular ( $r=0,6$ ,  $p=0,0175$ ,  $n=15$ ). A área marcada por NeuN no prosúbulo correlacionou-se positivamente com a área marcada por MT na camada molecular interna ( $r=0,529$ ,  $p=0,034$ ,  $n=16$ ), camada granular ( $r=0,506$ ,  $p=0,0442$ ,  $n=16$ ), camada subgranular ( $r=0,638$ ,  $p=0,00756$ ,  $n=16$ ), hilo ( $r=0,586$ ,  $p=0,0133$ ,  $n=17$ ) e em CA3 ( $r=0,556$ ,  $p=0,0373$ ,  $n=14$ ). Observamos correlação positiva entre a área de NeuN no subúbulo e as áreas de MT em CA1 ( $r=0,564$ ,  $p=0,0146$ ,  $n=18$ ) e no subúbulo ( $r=0,532$ ,  $p=0,0274$ ,  $n=17$ ).

Quanto à área imunopositiva para GFAP, apenas no subúbulo ela correlacionou-se positivamente com a área de MT na camada granular ( $r=0,559$ ,  $p=0,0238$ ,  $n=16$ ).

A área imunopositiva para MT na camada molecular interna correlacionou-se negativamente com a área imunopositiva para HLA-DR em CA1 ( $r=-0,47$ ;  $p=0,0483$ ;  $n=18$ ).

#### **4.10.4. Aquaporina 4 e populações celulares.**

*Grupo Ctrl:* observou-se correlação negativa entre a área de AQP4 na camada molecular interna e a densidade neuronal no subúbulo ( $r=-0,74$ ;  $p=0,02$ ;  $n=9$ ). A área imunopositiva para AQP4 em CA3 correlacionou-se positivamente com as áreas de NeuN em CA3 ( $r=0,75$ ;  $p=0,0158$ ;  $n=9$ ), CA2 ( $r=0,683$ ;  $p=0,0361$ ;  $n=9$ ) e CA1 ( $r=0,786$ ;  $p=0,0149$ ;  $n=8$ ). A área imunopositiva para NeuN em CA1 correlacionou-se positivamente com a área para AQP4 na camada granular ( $r=0,717$ ;  $p=0,0248$ ;  $n=9$ ) e no prosúbulo ( $r=0,738$ ;  $p=0,0287$ ;  $n=8$ ). A área

de NeuN no prosúbicula correlacionou-se positivamente com a área de AQP4 na camada molecular externa ( $r=0,75$ ;  $p=0,0384$ ;  $n=7$ ).

A área de GFAP na camada molecular externa correlacionou-se negativamente com as áreas de AQP4 na camada molecular externa ( $r=-0,456$ ;  $p=0,0429$ ;  $n=20$ ), hilo ( $r=-0,525$ ;  $p=0,0175$ ;  $n=20$ ) e CA4 ( $r=-0,533$ ;  $p=0,0186$ ;  $n=19$ ). A área de GFAP na camada molecular interna correlacionou-se negativamente com a área de AQP4 na camada molecular externa ( $r=-0,504$ ;  $p=0,0234$ ;  $n=20$ ), camada subgranular ( $r=-0,463$ ;  $p=0,0392$ ;  $n=20$ ), hilo ( $r=-0,636$ ;  $p=0,00256$ ;  $n=20$ ), CA4 ( $r=-0,796$ ;  $p=0$ ;  $n=19$ ) e subículo ( $r=-0,498$ ;  $p=0,0296$ ;  $n=19$ ). A área de GFAP na camada granular correlacionou-se negativamente com a área para AQP4 no hilo ( $r=-0,457$ ;  $p=0,0421$ ;  $n=20$ ) e em CA4 ( $r=-0,486$ ;  $p=0,0344$ ;  $n=19$ ). A área de GFAP na camada subgranular correlacionou-se negativamente com as áreas de AQP4 na camada granular ( $r=-0,624$ ;  $p=0,00328$ ;  $n=20$ ), camada subgranular ( $r=-0,481$ ;  $p=0,0314$ ;  $n=20$ ), hilo ( $r=-0,635$ ;  $p=0,00264$ ;  $n=20$ ), CA4 ( $r=-0,535$ ;  $p=0,0181$ ;  $n=19$ ) e no subículo ( $r=-0,677$ ;  $p=0,00134$ ;  $n=19$ ). No hilo, houve correlação negativa entre as áreas de GFAP e AQP4 ( $r=-0,461$ ;  $p=0,0459$ ;  $n=19$ ). A área imunopositiva para GFAP em CA4 correlacionou-se com as áreas de HLA-DR no hilo ( $r=-0,465$ ;  $p=0,0441$ ;  $n=19$ ) e CA4 ( $r=-0,519$ ;  $p=0,0225$ ;  $n=19$ ). A área de AQP4 em CA1 correlacionou-se negativamente com as áreas de GFAP em CA3 ( $r=-0,678$ ;  $p=0,00184$ ;  $n=18$ ) e CA2 ( $r=-0,682$ ;  $p=0,00167$ ;  $n=18$ ). A área de GFAP em CA1 correlacionou-se negativamente com a área de HLA-DR em CA4 ( $r=-0,533$ ;  $p=0,0186$ ;  $n=19$ ).

*Grupo ELTM:* A densidade neuronal em CA3 correlacionou-se positivamente com a área imunopositiva para AQP em CA4 ( $r=0,405$ ,  $p=0,0105$ ,  $n=39$ ) e CA3 ( $r=0,439$ ,  $p=0,0084$ ,  $n=35$ ). A densidade neuronal em CA2 correlacionou-se positivamente com a área de AQP na camada subgranular ( $r=0,414$ ,  $p=0,00231$ ,  $n=52$ ), hilo ( $r=0,49$ ,  $p=0,00023$ ,  $n=52$ ), CA4 ( $r=0,54$ ,  $p=0,00022$ ,  $n=42$ ), CA3 ( $r=0,457$ ,  $p=0,00451$ ,  $n=37$ ) e CA2 ( $r=0,418$ ,  $p=0,00385$ ,  $n=46$ ). A área imunopositiva para NeuN na camada granular correlacionou-se positivamente com a área de AQP em CA3 ( $r=0,435$ ,  $p=0,00636$ ,  $n=38$ ). Houve correlação positiva entre a área de NeuN em CA3 e a área de AQP no hilo ( $r=0,407$ ,  $p=0,00499$ ,  $n=46$ ) e em CA4 ( $r=0,413$ ,  $p=0,00894$ ,  $n=39$ ). A área de NeuN em CA2 correlacionou-se positivamente com a área de AQP em CA4 ( $r=0,429$ ,  $p=0,00457$ ,  $n=42$ ).

Não foram observadas correlações entre a área de AQP e a área de GFAP neste grupo.

*Grupo TD:* a única correlação observada no grupo TD foi entre a densidade neuronal em CA3 e a área imunopositiva para AQP no prosúbulo ( $r=0,774$ ,  $p=0,00368$ ,  $n=11$ ).

#### **4.10.5. Condroitin sulfato e populações celulares**

*Grupo Ctrl:* observaram-se correlações positivas entre a densidade neuronal na camada granular e a área de CS-56 na camada molecular interna ( $r=0,69$ ;  $p=0,0474$ ;  $n=8$ ) e entre a área de NeuN na camada granular e a área de CS-56 no hilo ( $r=0,905$ ;  $p=0$ ;  $n=8$ ) e em CA4 ( $r=0,75$ ;  $p=0,0384$ ;  $n=7$ ). A área de NeuN em CA4 correlacionou-se positivamente com a área de CS-56 na camada subgranular ( $r=0,786$ ;  $p=0,0251$ ;  $n=7$ ). A área de NeuN em CA3 correlacionou-se positivamente com a área de CS-56 em CA1 ( $r=0,821$ ;  $p=0,0145$ ;  $n=7$ ). A área de NeuN no subúbulo correlacionou-se positivamente com a área de CS-56 em CA1 ( $r=0,821$ ;  $p=0,0145$ ;  $n=7$ ). A densidade neuronal em CA4 correlacionou-se negativamente com a área de CS-56 no hilo ( $r=-0,793$ ;  $p=0,0251$ ;  $n=7$ ). Observou-se correlação negativa entre a densidade neuronal em CA1 e a área de CS-56 em CA4 ( $r=-0,841$ ;  $p=0,0333$ ;  $n=6$ ).

A área de GFAP em CA3 correlacionou-se positivamente com as áreas de CS-56 na camada molecular externa ( $r=0,556$ ;  $p=0,02$ ;  $n=17$ ), camada molecular interna ( $r=0,537$ ;  $p=0,0258$ ;  $n=17$ ), CA2 ( $r=0,575$ ;  $p=0,0241$ ;  $n=15$ ) e subúbulo ( $r=0,579$ ;  $p=0,0182$ ;  $n=16$ ). A área de GFAP em CA2 correlacionou-se positivamente com a área de CS-56 na camada molecular externa ( $r=0,527$ ;  $p=0,0291$ ;  $n=17$ ). A área de GFAP no subúbulo correlacionou-se positivamente com a área de CS-56 no prosúbulo ( $r=0,592$ ;  $p=0,0387$ ;  $n=12$ ).

A área imunopositiva para HLA-DR na camada granular correlacionou-se negativamente com a área de CS no hilo ( $r=-0,478$ ;  $p=0,044$ ;  $n=18$ ). Observou-se correlação positiva entre a área de HLA-DR em CA4 e a área de CS-56 na camada subgranular ( $r=0,532$ ;  $p=0,0329$ ;  $n=16$ ). A área de HLA-DR em CA3 correlacionou-se positivamente com a área de CS-56 no prosúbulo ( $r=0,756$ ;  $p=0,00565$ ;  $n=11$ ). A área de HLA-DR em CA2 correlacionou-se positivamente com as áreas de CS-56 na camada molecular interna ( $r=0,501$ ;  $p=0,0457$ ;  $n=16$ ), camada subgranular ( $r=0,634$ ;  $p=0,00794$ ;  $n=16$ ), CA1 ( $r=0,525$ ;  $p=0,0352$ ;  $n=16$ ) e prosúbulo ( $r=0,715$ ;  $p=0,011$ ;  $n=11$ ). A área de HLA-DR em CA1 correlacionou-se

positivamente com as áreas de CS-56 na camada subgranular ( $r=0,48$ ;  $p=0,0497$ ;  $n=17$ ) e no prosúbiculo ( $r=0,615$ ;  $p=0,0308$ ;  $n=12$ ).

Grupo ELTM: observaram-se correlações entre a área de HLA-DR no hilo e as áreas de CS-56 na camada molecular externa ( $r=0,431$ ;  $p=0,00199$ ;  $n=49$ ), camada molecular interna ( $r=0,549$ ;  $p=0,0000439$ ;  $n=49$ ), camada granular ( $r=0,482$ ;  $p=0,000453$ ;  $n=49$ ), camada subgranular ( $r=0,405$ ;  $p=0,00392$ ;  $n=49$ ), hilo ( $r=0,406$ ;  $p=0,00379$ ;  $n=49$ ), CA4 ( $r=0,537$ ;  $p=0,00154$ ;  $n=32$ ), CA3 ( $r=0,538$ ;  $p=0,00216$ ;  $n=30$ ) e CA2 ( $r=0,479$ ;  $p=0,00859$ ;  $n=29$ ). A área imunopositiva para HLA-DR em CA3 correlacionou-se positivamente com as áreas de CS-56 na camada molecular externa ( $r=0,597$ ;  $p=0,000155$ ;  $n=35$ ), camada molecular interna ( $r=0,559$ ;  $p=0,000484$ ;  $n=35$ ), camada granular ( $r=0,552$ ;  $p=0,000588$ ;  $n=35$ ), camada subgranular ( $r=0,526$ ;  $p=0,00119$ ;  $n=35$ ), hilo ( $r=0,639$ ;  $p=0,0000207$ ;  $n=37$ ), CA4 ( $r=0,627$ ;  $p=0,000211$ ;  $n=30$ ), CA3 ( $r=0,558$ ;  $p=0,00201$ ;  $n=28$ ), CA2 ( $r=0,571$ ;  $p=0,00234$ ;  $n=26$ ) e prosúbiculo ( $r=0,43$ ;  $p=0,0225$ ;  $n=28$ ). A área de HLA-DR em CA2 correlacionou-se positivamente com as áreas de CS-56 na camada molecular externa ( $r=0,701$ ;  $p=0,00000775$ ;  $n=32$ ), camada molecular interna ( $r=0,54$ ;  $p=0,00141$ ;  $n=32$ ), camada granular ( $r=0,563$ ;  $p=0,000797$ ;  $n=32$ ), camada subgranular ( $r=0,64$ ;  $p=0,0000801$ ;  $n=32$ ), hilo ( $r=0,572$ ;  $p=0,000504$ ;  $n=33$ ), CA4 ( $r=0,588$ ;  $p=0,0025$ ;  $n=24$ ), CA3 ( $r=0,598$ ;  $p=0,0033$ ;  $n=22$ ) e CA2 ( $r=0,556$ ;  $p=0,00589$ ;  $n=23$ ). A área de HLA-DR em CA1 correlacionou-se positivamente com as áreas de CS-56 na camada molecular interna ( $r=0,533$ ;  $p=0,0000682$ ;  $n=50$ ), camada granular ( $r=0,502$ ;  $p=0,000203$ ;  $n=50$ ), camada subgranular ( $r=0,415$ ;  $p=0,00271$ ;  $n=50$ ), hilo ( $r=0,5$ ;  $p=0,000184$ ;  $n=51$ ), CA4 ( $r=0,6$ ;  $p=0,000227$ ;  $n=33$ ), CA3 ( $r=0,42$ ;  $p=0,0185$ ;  $n=31$ ) e CA2 ( $r=0,473$ ;  $p=0,00833$ ;  $n=30$ ). A área de HLA-DR no prosúbiculo correlacionou-se positivamente com a área de CS-56 em CA4 ( $r=0,417$ ;  $p=0,0476$ ;  $n=23$ ) e CA3 ( $r=0,454$ ;  $p=0,0296$ ;  $n=23$ ). A área de HLA-DR no subúbiculo correlacionou-se positivamente com a área de CS-56 em CA4 ( $r=0,455$ ;  $p=0,0149$ ;  $n=28$ ) e CA3 ( $r=0,607$ ;  $p=0,00101$ ;  $n=26$ ).

Não foram observadas correlações entre a área de CS-56 e as áreas de GFAP e NeuN, nem em relação à densidade neuronal.

*Grupo TD:* Observaram-se correlações positivas entre a densidade neuronal em CA3 e as áreas de CS-45 na camada molecular externa ( $r=0,586$ ;  $p=0,0262$ ;  $n=14$ ) camada molecular

interna ( $r=0,623$ ;  $p=0,0167$ ;  $n=14$ ), camada granular ( $r=0,725$ ;  $p=0,00289$ ;  $n=14$ ), camada subgranular ( $r=0,551$ ;  $p=0,0391$ ;  $n=14$ ), CA3 ( $r=0,551$ ;  $p=0,049$ ;  $n=13$ ), CA2 ( $r=0,702$ ;  $p=0,0145$ ;  $n=11$ ) e CA1 ( $r=0,575$ ;  $p=0,0306$ ;  $n=14$ ). A área imunopositiva para NeuN correlacionou-se com as áreas de CS-56 na camada molecular interna ( $r=0,697$ ;  $p=0,00239$ ;  $n=16$ ), camada granular ( $r=0,615$ ;  $p=0,011$ ;  $n=16$ ) e hilo ( $r=0,706$ ;  $p=0,00193$ ;  $n=16$ ). A área de NeuN em CA3 correlacionou-se positivamente com as áreas de CS-56 na camada granular ( $r=0,582$ ;  $p=0,0276$ ;  $n=14$ ), camada subgranular ( $r=0,565$ ;  $p=0,0338$ ;  $n=14$ ) e prosúbulo ( $r=0,608$ ;  $p=0,0333$ ;  $n=12$ ). A área de NeuN em CA2 correlacionou-se positivamente com a área de CS-56 no prosúbulo ( $r=0,608$ ;  $p=0,0333$ ;  $n=12$ ).

Observou-se correlação negativa entre a área de GFAP em CA4 e a área de CS-56 em CA2 ( $r=-0,6$ ;  $p=0,0467$ ;  $n=11$ ). A área de GFAP em CA1 correlacionou-se positivamente com a área de CS-56 na camada molecular externa ( $r=0,472$ ;  $p=0,0472$ ;  $n=18$ ). A área de GFAP no prosúbulo correlacionou-se positivamente com as áreas de CS-56 na camada molecular externa ( $r=0,55$ ;  $p=0,0325$ ;  $n=15$ ) e no subículo ( $r=0,521$ ;  $p=0,0446$ ;  $n=15$ ).

Observaram-se correlações positivas entre a área de HLA-DR em CA4 e as áreas de CS-56 na camada molecular interna ( $r=0,534$ ;  $p=0,047$ ;  $n=14$ ) e na camada subgranular ( $r=0,56$ ;  $p=0,0355$ ;  $n=14$ ). No prosúbulo, a área de HLA-DR correlacionou-se positivamente com a área de CS-56 ( $r=0,733$ ;  $p=0,00807$ ;  $n=11$ ).

#### ***4.10.6. Ácido hialurônico e populações celulares***

*Grupo Ctrl:* observaram-se correlações positivas entre a área imunopositiva para NeuN em CA3 e os níveis de cinza de HABP em CA4 ( $r=0,975$ ;  $p=0,0167$ ;  $n=5$ ) e CA3 ( $r=0,975$ ;  $p=0,0167$ ;  $n=5$ ). A área de NeuN no subículo correlacionou-se positivamente com o nível de cinza de HABP no hilo ( $r=0,928$ ;  $p=0,0167$ ;  $n=6$ ).

A área de GFAP na camada molecular externa correlacionou-se negativamente com os níveis de cinza de HABP na camada subgranular ( $r=-0,673$ ;  $p=0,029$ ;  $n=10$ ), hilo ( $r=-0,659$ ;  $p=0,0332$ ;  $n=10$ ) e subículo ( $r=-0,669$ ;  $p=0,029$ ;  $n=10$ ). O nível de cinza de HABP no hilo correlacionou-se negativamente com a área de GFAP na camada molecular interna ( $r=-0,64$ ;  $p=0,0427$ ;  $n=10$ ) e camada granular ( $r=-0,628$ ;  $p=0,048$ ;  $n=10$ ). A área de GFAP em CA4

correlacionou-se negativamente com o nível de cinza de HABP em CA3 ( $r=-0,703$ ;  $p=0,0301$ ;  $n=9$ ). A área imunopositiva para GFAP em CA3 correlacionou-se negativamente com os níveis de cinza de HABP na camada molecular externa ( $r=-0,667$ ;  $p=0,0428$ ;  $n=9$ ), camada molecular interna ( $r=-0,795$ ;  $p=0,00625$ ;  $n=9$ ), camada subgranular ( $r=-0,733$ ;  $p=0,02$ ;  $n=9$ ) e CA4 ( $r=-0,748$ ;  $p=0,0158$ ;  $n=9$ ). A área de GFAP em CA2 correlacionou-se negativamente com os níveis de cinza de HABP na camada molecular interna ( $r=-0,695$ ;  $p=0,0301$ ;  $n=9$ ) e camada subgranular ( $r=-0,717$ ;  $p=0,0248$ ;  $n=9$ ). A área de GFAP em CA1 correlacionou-se negativamente com os níveis de cinza de HABP na camada subgranular ( $r=-0,709$ ;  $p=0,0186$ ;  $n=10$ ), hilo ( $r=-0,829$ ;  $p=0$ ;  $n=10$ ) e CA4 ( $r=-0,672$ ;  $p=0,0428$ ;  $n=9$ ). Observaram-se correlações negativas entre a área de GFAP no prosúbulo e os níveis de cinza de HABP na camada molecular externa ( $r=-0,778$ ;  $p=0,0149$ ;  $n=8$ ), camada molecular interna ( $r=-0,892$ ;  $p=0$ ;  $n=8$ ), camada subgranular ( $r=-0,946$ ;  $p=0$ ;  $n=8$ ), hilo ( $r=-0,897$ ;  $p=0$ ;  $n=8$ ) e CA4 ( $r=-0,703$ ;  $p=0,0374$ ;  $n=8$ ). A área de GFAP no subículo correlacionou-se negativamente com o nível de cinza de HABP na camada subgranular ( $r=-0,7$ ;  $p=0,0301$ ;  $n=9$ ).

Observaram-se correlações positivas entre a área de HLA-DR na camada subgranular e os níveis de cinza de HABP em CA3 ( $r=0,762$ ;  $p=0,0121$ ;  $n=9$ ) e CA1 ( $r=0,709$ ;  $p=0,0186$ ;  $n=10$ ).

*Grupo ELTM:* observaram-se correlações positivas entre a área de HABP na camada subgranular e as áreas de NeuN em CA4 ( $r=0,483$ ;  $p=0,011$ ;  $n=27$ ), CA3 ( $r=0,468$ ;  $p=0,0371$ ;  $n=20$ ) e CA2 ( $r=0,437$ ;  $p=0,0329$ ;  $n=24$ ). A área de NeuN em CA2 correlacionou-se positivamente com o nível de cinza de HABP no hilo ( $r=0,416$ ;  $p=0,0479$ ;  $n=23$ ). A área de HABP no prosúbulo correlacionou-se positivamente com a área de NeuN na camada granular ( $r=0,406$ ;  $p=0,0396$ ;  $n=26$ ).

Observaram-se correlações negativas entre a área de GFAP na camada molecular externa e os níveis de cinza de HABP no prosúbulo ( $r=-0,413$ ;  $p=0,04$ ;  $n=25$ ) e subículo ( $r=-0,607$ ;  $p=0,00105$ ;  $n=26$ ). A área de GFAP na camada molecular interna correlacionou-se negativamente com os níveis de cinza de HABP em CA2 ( $r=-0,518$ ;  $p=0,0389$ ;  $n=16$ ), prosúbulo ( $r=-0,452$ ;  $p=0,0233$ ;  $n=25$ ) e subículo ( $r=-0,511$ ;  $p=0,00783$ ;  $n=26$ ). A área de GFAP na camada granular correlacionou-se positivamente com os níveis de cinza de HABP

no subículo ( $r=-0,492$ ;  $p=0,0109$ ;  $n=26$ ). A área de GFAP em CA4 correlacionou-se negativamente com os níveis de cinza de HABP no hilo ( $r=-0,462$ ;  $p=0,0232$ ;  $n=24$ ). A área de GFAP em CA1 correlacionou-se negativamente com o nível de cinza de HABP no subículo ( $r=-0,421$ ;  $p=0,0323$ ;  $n=26$ ). Observou-se correlação positiva entre a área de GFAP no prosúbulo e a área de HABP em CA3 ( $r=0,597$ ;  $p=0,0467$ ;  $n=11$ ). Houve correlação negativa entre as áreas de GFAP e nível de cinza de HABP no subículo ( $r=-0,514$ ;  $p=0,00746$ ;  $n=26$ ).

A área de HLA-DR na camada molecular externa correlacionou-se negativamente com os níveis de cinza de HABP na camada molecular externa ( $r=-0,607$ ;  $p=0$ ;  $n=28$ ) e camada molecular interna ( $r=-0,451$ ;  $p=0,0162$ ;  $n=28$ ). A área de HLA-DR na camada molecular interna correlacionou-se negativamente com os níveis de cinza de HABP na camada molecular externa ( $r=-0,434$ ;  $p=0,0214$ ;  $n=28$ ) e positivamente com o nível de cinza em CA4 ( $r=0,513$ ;  $p=0,0347$ ;  $n=17$ ). A camada granular correlacionou-se positivamente com o nível de cinza em CA4 ( $r=0,589$ ;  $p=0,0128$ ;  $n=17$ ). Observaram-se correlações negativas entre a área de HLA-DR na camada subgranular e os níveis de cinza de HABP na camada molecular externa ( $r=-0,423$ ;  $p=0,025$ ;  $n=28$ ). A área de HLA-DR no hilo correlacionou-se negativamente com o nível de cinza de HABP no subículo ( $r=-0,449$ ;  $p=0,0313$ ;  $n=23$ ). A área de HLA-DR em CA4 correlacionou-se negativamente com o nível de cinza no prosúbulo ( $r=-0,635$ ;  $p=0,00606$ ;  $n=17$ ). A área de HLA em CA3 correlacionou-se positivamente com os níveis de cinza de HABP em CA4 ( $r=0,594$ ;  $p=0,0192$ ;  $n=15$ ). A área imunopositiva para HLA-DR em CA2 correlacionou-se positivamente com o nível de cinza de HABP em CA4 ( $r=0,602$ ;  $p=0,0359$ ;  $n=12$ ).

*Grupo TD:* observaram-se correlações positivas entre a densidade neuronal da camada granular e os níveis de cinza de HABP na camada molecular externa ( $r=0,833$ ;  $p=0,00526$ ;  $n=8$ ), camada molecular interna ( $r=0,857$ ;  $p=0,00178$ ;  $n=8$ ), camada subgranular ( $r=0,83$ ;  $p=0,00526$ ;  $n=8$ ), hilo ( $r=0,831$ ;  $p=0,00526$ ;  $n=8$ ) e subículo ( $r=0,739$ ;  $p=0,0384$ ;  $n=7$ ). A densidade neuronal em CA4 correlacionou-se negativamente com o nível de cinza de HABP no prosúbulo ( $r=-0,883$ ;  $p=0,0333$ ;  $n=6$ ). A densidade neuronal de CA1 correlacionou-se negativamente com o nível de cinza de HABP no prosúbulo ( $r=-0,755$ ;  $p=0,0384$ ;  $n=7$ ). A

densidade neuronal do prosúbicula correlacionou-se positivamente com o nível de cinza de HABP do hilo ( $r=0,775$ ;  $p=0,0251$ ;  $n=7$ ) e negativamente com o nível de cinza no prosúbicula ( $r=-0,757$ ;  $p=0,0384$ ;  $n=7$ ). A área de NeuN na camada granular correlacionou-se positivamente com os níveis de cinza de HABP na camada molecular externa ( $r=0,833$ ;  $p=0,00526$ ;  $n=8$ ), camada molecular interna ( $r=0,81$ ;  $p=0,0096$ ;  $n=8$ ), camada subgranular ( $r=0,805$ ;  $p=0,0096$ ;  $n=8$ ) e hilo ( $r=0,892$ ;  $p=0$ ;  $n=8$ ). A área de NeuN em CA4 correlacionou-se positivamente com o nível de cinza do hilo ( $r=0,764$ ;  $p=0,0384$ ;  $n=7$ ) e negativamente com o nível de cinza de HABP do subúbicula ( $r=-0,886$ ;  $p=0,0333$ ;  $n=6$ ). Observaram-se correlações positivas entre a área de NeuN no prosúbicula e os níveis de cinza de HABP na camada subgranular ( $r=0,741$ ;  $p=0,0384$ ;  $n=7$ ) e hilo ( $r=0,811$ ;  $p=0,0145$ ;  $n=7$ ).

A área de GFAP em CA2 correlacionou-se negativamente com o nível de cinza de HABP em CA1 ( $r=-0,886$ ;  $p=0,0333$ ;  $n=6$ ). Observaram-se correlações negativas entre a área de GFAP em CA1 e os níveis de cinza de HABP na camada molecular interna ( $r=-0,881$ ;  $p=0$ ;  $n=8$ ), camada subgranular ( $r=-0,903$ ;  $p=0$ ;  $n=8$ ), hilo ( $r=-0,759$ ;  $p=0,0212$ ;  $n=8$ ) e CA1 ( $r=-0,714$ ;  $p=0,0374$ ;  $n=8$ ). A área de GFAP no subúbicula correlacionou-se negativamente com o nível de cinza de HABP no prosúbicula ( $r=-0,928$ ;  $p=0,0167$ ;  $n=6$ ).

A área de HLA-DR na camada molecular externa correlacionou-se positivamente com o nível de cinza de HABP em CA1 ( $r=0,75$ ;  $p=0,0384$ ;  $n=7$ ). A área de HLA-DR em CA4 correlacionou-se positivamente com o nível de cinza de HABP na camada molecular externa ( $r=1$ ;  $p=0,0167$ ;  $n=5$ ). Observaram-se correlações negativas entre a área de HLA-DR em CA1 e os níveis de cinza de HABP na camada molecular interna ( $r=-0,929$ ;  $p=0$ ;  $n=7$ ), camada subgranular ( $r=-0,852$ ;  $p=0,00609$ ;  $n=7$ ), hilo ( $r=-0,775$ ;  $p=0,0251$ ;  $n=7$ ) e CA1 ( $r=-0,75$ ;  $p=0,0384$ ;  $n=7$ ). A área de HLA-DR no subúbicula correlacionou-se negativamente com os níveis de cinza de HABP na camada molecular externa ( $r=-0,893$ ;  $p=0$ ;  $n=7$ ) e CA1 ( $r=-0,786$ ;  $p=0,0251$ ;  $n=7$ ).

#### **4.11. Regressões**

A região CA1, que é uma das mais afetadas pela esclerose hipocampal e ocupa grande parte do hipocampo, apresentou correlações entre o volume hipocampal total e os neurônios, astrócitos reativos e condroitin sulfato no grupo ELTM. No item Correlações foram citadas apenas as correlações da população neuronal com o volume, uma vez que as correlações entre o volume hipocampal e os astrócitos reativos ou condroitin sulfato ficaram abaixo do critério de inclusão das correlações (i.e., seus valores dos coeficientes de correlação foram, em módulo, menor que 0,4). Para as regressões múltiplas, entretanto, estas correlações serão consideradas.

Por regressão linear, a densidade neuronal ( $r=0,405$ ;  $p<0,001$ ) e as áreas imunopositivas para NeuN ( $r=0,451$ ;  $p<0,001$ ), GFAP ( $r=-0,275$ ;  $p=0,023$ ) e CS-56 ( $r=0,295$ ;  $p=0,024$ ) explicaram parcialmente o volume hipocampal (Figuras 64 e 65).

Como as medidas densidade neuronal e área imunopositiva para NeuN são duas formas de avaliar a mesma característica (i.e., a população neuronal), serão construídos modelos separados para cada uma delas. Se colocadas juntas, a interação entre elas é tão forte que ambas deixam de ter qualquer efeito sobre o volume hipocampal (com VIF de 22,359 para densidade neuronal e 24,3 para área de NeuN).

Combinando-se área de GFAP, área de CS-56 e área de NeuN ou densidade neuronal, o efeito dos astrócitos reativos sobre o volume torna-se não significativo em comparação com o efeito da população neuronal e do condroitin sulfato. A combinação das áreas (GFAP, NeuN e CS-56) predisse 37% do volume hipocampal ( $R^2=0,374$ ;  $p<0,001$ ), com  $p<0,001$  para NeuN,  $p=0,841$  para GFAP e  $p=0,020$  para CS-56. A combinação da densidade neuronal com as áreas de GFAP e CS-56 predisse 36% do volume hipocampal ( $R^2=0,358$ ;  $p<0,001$ ), com  $p<0,001$  para densidade neuronal,  $p=0,843$  para GFAP e  $p=0,018$  para CS-56.

As equações destas regressões foram:

$$V_t = 2,021 + (0,00186 * A_{\text{NeuNCA1}}) + (0,0000224 * A_{\text{GFAPCA1}}) + (0,000340 * A_{\text{CS-56CA1}})$$

$$V_t = 2,099 + (0,0299 * d_{\text{neuronalCA1}}) - (0,0000216 * A_{\text{GFAPCA1}}) + (0,000351 * A_{\text{CS-56CA1}})$$

Onde  $V_t$ : volume total do hipocampo ipsilateral;  $A_{\text{NeuNCA1}}$  = área imunopositiva para NeuN em CA1;  $d_{\text{neuronalCA1}}$ : densidade neuronal em CA1;  $A_{\text{GFAP}}$  = área imunopositiva para GFAP em CA1;  $A_{\text{CS-56CA1}}$ : área imunopositiva para CS-56 em CA1.

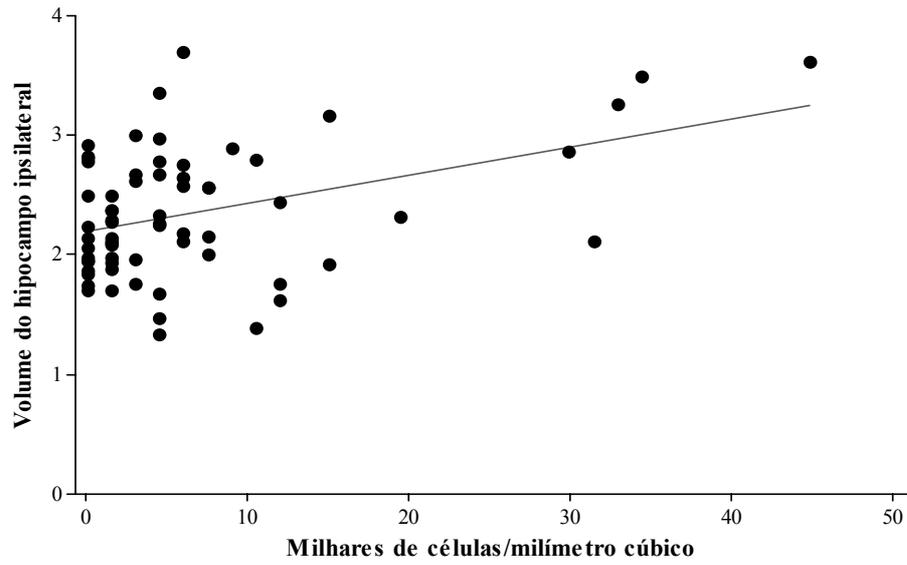
Retirando-se a área imunopositiva para GFAP destes modelos, o valor preditivo de ambos não é significativamente alterado. As áreas imunopositivas para CS-56 e NeuN predisseram 37% do volume hipocampal ( $R^2=0,372$ ;  $p<0,001$ ), com  $p<0,001$  para NeuN e  $p=0,02$  para CS-56. A densidade neuronal e a área imunopositiva para CS-56 em CA1 explicam aproximadamente 36% do volume hipocampal total ( $R^2=0,357$ ;  $p<0,001$ ), com  $p<0,001$  para NeuN e  $p=0,018$  para CS-56.

No modelo final as equações das regressões foram:

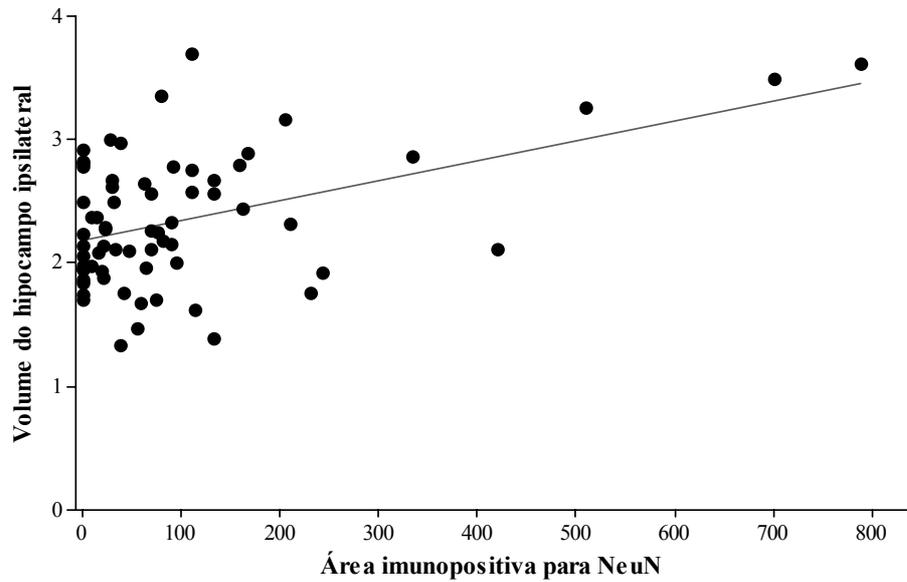
$$Vt = 2,067 + (0,00182 * A_{\text{NeuN}}\text{CA1}) + (0,000334 * A_{\text{CS-56}}\text{CA1})$$

$$Vt = 2,050 + (0,0309 * d_{\text{neuronal}}\text{CA1}) + (0,000343 * A_{\text{CS-56}}\text{CA1})$$

Onde Vt: volume total do hipocampo ipsilateral;  $A_{\text{NeuN}}\text{CA1}$  = área imunopositiva para NeuN em CA1;  $d_{\text{neuronal}}\text{CA1}$ : densidade neuronal em CA1;  $A_{\text{CS-56}}\text{CA1}$ : área imunopositiva para CS-56 em CA1.

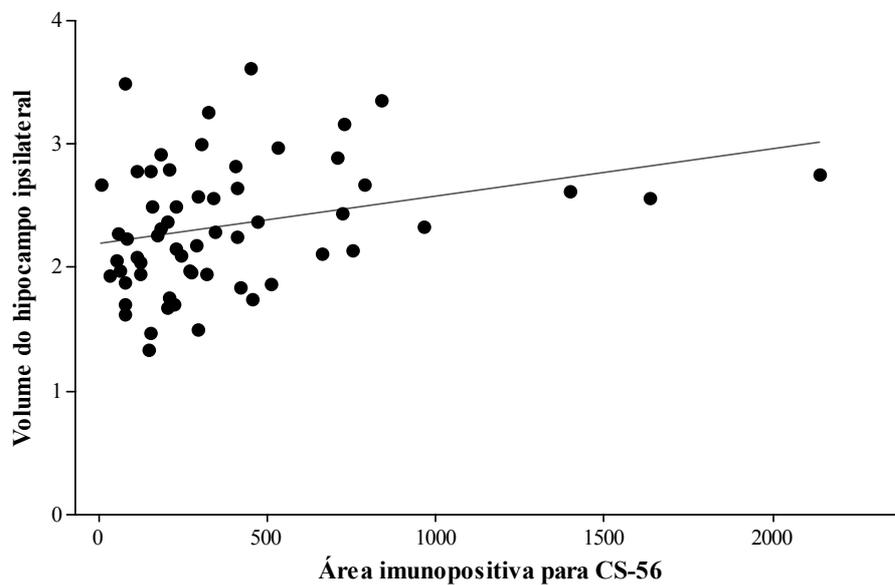


$$V_t = 2,195 + (0,0234 * d_{\text{neuronal CA1}})$$

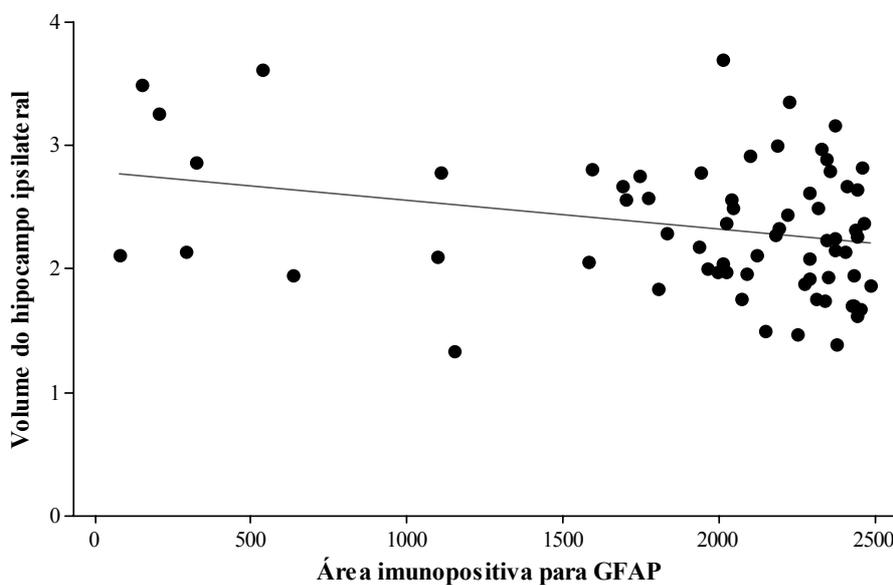


$$V_t = 2,191 + (0,00160 * A_{\text{NeuN CA1}})$$

**Figura 64.** Regressão linear (gráfico e equação de reta) entre densidade neuronal em CA1 e volume hipocampal (A) e entre área imunopositiva para NeuN em CA1 e volume hipocampal (B).  $V_t$ : volume total do hipocampo ipsilateral;  $d_{\text{neuronal CA1}}$ : densidade neuronal em CA1;  $A_{\text{NeuN CA1}}$ : área imunopositiva para NeuN em CA1.



$$Vt=2,191 + (0,000388 * A_{CS-56}CA1)$$



$$Vt=2,782 - (0,000231 * A_{GFAP}CA1)$$

**Figura 65.** Regressão linear (gráfico e equação de reta) entre entre área imunopositiva para CS-56 em CA1 e volume hipocampal (A) e entre área imunopositiva para GFAP e volume hipocampal (B). Vt: volume total do hipocampo ipsilateral;  $A_{CS-56}CA1$ : área imunopositiva para CS-56 em CA1;  $A_{GFAP}$  = área imunopositiva para GFAP em CA1.

## 5. DISCUSSÃO

Tabela 3. Resumo das alterações observadas em relação ao grupo Ctrl.

Marcador	Grupo	Região										
		M Ex	M In	CG	CSG	Hilo	CA4	CA3	CA2	CA1	Pros	Sub
NeuN Densidade	VN	—	—	↓	—	—	↓	↓	↓	↓	∅	∅
	AL	—	—	↓	—	—	↓	↓	↓	↓	↓	∅
	AG	—	—	↓	—	—	↓	↓	↓	↓	↓	∅
	TD	—	—	∅	—	—	∅	↓	∅	∅	∅	∅
NeuN Área	VN	—	—	↓	—	—	↓	↓	∅	∅	∅	↑
	AL	—	—	↓	—	—	∅	↓	∅	↓	∅	∅
	AG	—	—	↓	—	—	↓	↓	∅	↓	∅	∅
	TD	—	—	∅	—	—	∅	∅	∅	∅	∅	∅
GFAP Área	VN	↑	↑	↑	∅	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	AL	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	AG	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	TD	↑	↑	↑	↑	↑	↑	∅	∅	∅	∅	∅
MT Área	VN	↑	∅	∅	↑	↑	∅	∅	∅	↑	↑	∅
	AL	∅	∅	∅	↑	↑	∅	↑	↑	↑	∅	∅
	AG	↑	∅	∅	↑	↑	↑	↑	↑	↑	∅	↑
	TD	↑	↑	∅	↑	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
AQP Área	VN	∅	∅	∅	↓	↓	↓	∅	∅	∅	∅	∅
	AL	∅	∅	∅	∅	↓	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	AG	∅	∅	∅	↓	∅	↓	∅	∅	↓	∅	∅
	TD	∅	∅	∅	∅	∅	↓	∅	∅	∅	∅	∅
CS Área	VN	↑	↑	∅	∅	∅	∅	∅	↑	↑	↑	↑
	AL	∅	∅	∅	∅	∅	↑	↑	∅	∅	↑	↑
	AG	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	↓	↑	∅
	TD	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
HÁBP Área	VN	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	AL	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	AG	∅	∅	∅	↓	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	TD	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

↑: aumento; ↓: redução; ∅: inalterado; —: dado não coletado. M Ex: camada molecular externa; M In: camada molecular interna; CG: camada granular; CSG: camada subgranular; Pros: prosúbicula; Sub: *subiculum*.

### **5.1. Alterações Neuronais**

A análise através da avaliação da densidade neuronal revelou perda em quase todas as regiões hipocâmpais no grupo ELTM, sem diferenças de densidade quanto aos perfis de volume hipocâmpal. A única exceção foi o subículo, que não apresentou alterações significativas na densidade neuronal. A redução de densidade foi mais grave nas regiões CA1, CA3 CA4, que apresentaram densidades, em relação ao grupo controle, de 6%, 40% e 38%, respectivamente. Houve também perda celular grave na camada granular, com densidade de 50% dos valores do controle, e no prosúbulo, com 58% da densidade do controle. A região CA2 apresentou menor redução da densidade neuronal, com 72% dos valores do grupo controle. Em geral, os padrões de perda encontrados nesta casuística estão dentro dos relatados na literatura (Margerison e Corsellis, 1966; Babb *et al.*, 1984; Babb *et al.*, 1991; Mathern *et al.*, 1996; Nadler, 2003) com as regiões CA1, CA4 e prosúbulo mais vulneráveis à morte neuronal, CA3 e a camada granular com níveis intermediários de perda e as regiões CA2 e subículo preservadas. Apesar de descrita como preservada, a região CA2 apresentou perda neuronal significativa, concordando com estudos de Dam (1980), Van Paesschen e colaboradores (1997) e Leite e colaboradores (2000). Mathern e colaboradores (1997) observaram dispersão das células granulares. Em grupos de ELT com esclerose hipocâmpal, além da redução da densidade há redução do número absoluto de neurônios, indicando que a redução da densidade, em ELTM, não é mero efeito da dispersão das células (Mathern *et al.*, 1997).

O grupo TD apresentou preservação de densidade neuronal em todas as áreas hipocâmpais, exceto pela região CA3. Pacientes com ELT extrahipocâmpal apresentam preservação da densidade neuronal hipocâmpal (Babb *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 1990). Quando apresentam perda neuronal, esta é sempre em menor grau, quando comparada ao grau de perda em pacientes com ELTM e esclerose hipocâmpal (Mathern *et al.*, 1997; Diehl *et al.*, 2002; Diehl *et al.*, 2004). Kim e colaboradores (1990) observaram preservação da densidade neuronal em todas as regiões do hipocampo em casos com tumor. De todas as regiões avaliadas, a região CA3 apresentou a menor densidade em relação aos valores do controle, com 75% da densidade do grupo controle (Kim *et al.*, 1990). Em nosso estudo, esta foi a única região com redução significativa da densidade neuronal, para 66% dos valores do nosso grupo controle. Diehl e colaboradores (2002) observaram que, apesar de o grupo com apenas esclerose hipocâmpal apresentar maior perda do que o grupo com displasia cortical associada à esclerose, a perda na região CA3 ocorreu no mesmo grau nestes dois grupos. Estes estudos

indicam que, em casos de lesões extrahipocampais, associadas ou não à esclerose hipocampal, a região CA3 é mais vulnerável que as demais.

A análise da área positiva para o antígeno NeuN revelou concordância com os dados de densidade neuronal, com redução da área imunorreativa nos grupos com ELTM em relação ao grupo Ctrl ou TD. Uma exceção foi o subículo, onde a área imunorreativa foi maior no grupo de pacientes com volume hipocampal normal do que no grupo controle. Este aumento na área imunorreativa ocorreu por aumento na área celular média imunorreativa ao NeuN e não por aumento na densidade neuronal, revelando que outras alterações patológicas, além da redução de densidade neuronal, podem afetar a população neuronal no hipocampo ligado às crises. Apesar de encontrarmos redução na área celular média imunorreativa para NeuN em CA3 dos grupos AL e AG e na área imunopositiva em CA2 e no prosúbulo do grupo AG, estas alterações foram em relação aos níveis do grupo TD. Os níveis do grupo TD, apesar de não serem estatisticamente diferentes, eram um pouco superiores aos níveis do grupo Ctrl. Assim, não podemos descartar a possibilidade de que estas diferenças sejam um artefato criado pelo leve aumento no grupo TD. Collombert e colaboradores (2006) demonstraram, em ratos submetidos a envenenamento por Soman, que a imuno-reatividade de NeuN pode ser reduzida sem alteração nos níveis de expressão desta proteína. Notaram, ainda, que neurônios imunonegativos para NeuN eram positivos para marcadores de degeneração celular. Acreditamos que a alteração que observamos em relação à área imunopositiva decorre das alterações na densidade neuronal, nas medidas de área imunorreativa total e celular do que por perda de antigenicidade, uma vez que excluímos todos os casos com células que tivessem morfologia neuronal e fossem imunonegativas para NeuN e que todas as células contadas apresentavam imuno-marcação consistente com a marcação padrão desta proteína (1996).

Vários trabalhos evidenciam correlação entre alterações no volume hipocampal, avaliado na RNM, e alterações patológicas, principalmente grau de perda neuronal no Corno de Amon, no hipocampo de pacientes com ELT (Jackson *et al.*, 1990; Cascino *et al.*, 1991; Lencz *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1994; Van Paesschen *et al.*, 1997; Bronen *et al.*, 1997; Lehericy *et al.*, 1997; Vossler *et al.*, 1998; Kuzniecky *et al.*, 2001; Diehl *et al.*, 2002; Diehl *et al.*, 2004; Goncalves Pereira *et al.*, 2006). Destes, apenas poucos fazem avaliação quantitativa tanto na RNM quanto na patologia. Van Paeschen e colaboradores (1997) apontaram correlação entre alterações do Corno de Amon e hilo com a volumetria hipocampal, sendo que CA1 apresentou a melhor correlação ( $r=-0,59$ ). Kuzniecky e colaboradores (2001) observaram correlação entre o volume hipocampal e a alterações patológicas no Corno de Amon

( $r=0,465$ ). Tanto Van Paeschen e colaboradores (1997) quanto Kuzniecky e colaboradores (2001) utilizaram razões entre a densidade neuronal e a densidade glial. Porém, este método atribui mesmo peso às densidades neuronal e glial em relação a alterações no volume hipocampal, desconsiderando a diferença de volumes destes dois tipos celulares. Um valor de correlação similar ao de Van Paeschen e colaboradores (1997) foi observado por Vossler e colaboradores (1998), com correlação entre a gravidade da esclerose hipocampal e o grau de assimetria hipocampal ( $r=-0,57$ ). Diehl e colaboradores (2002, 2004) observaram associação entre volume hipocampal e a porcentagem de perda neuronal, relativa aos valores normais, principalmente em CA1 ( $r=-0,677$ ) e na camada granular ( $r=-0,52$ ) (2002) e que ocorria menor densidade em CA1 nos casos com menor volume hipocampal (2004). Briellman e colaboradores (2002) também observaram correlação entre o volume hipocampal e a densidade neuronal da camada granular ( $r=0,4$ ), mas não entre volume e a densidade de CA1.

Em nosso trabalho, considerando-se a casuística de ELTM total, apenas a área marcada por NeuN e a densidade neuronal na região CA1 correlacionaram-se com o volume total do hipocampo ipsilateral, com coeficientes de correlação moderados, semelhante ao observado entre a densidade neuronal e o volume hipocampal por Kuzniecky e colaboradores (2001). Quando observadas as correlações grupo a grupo, houveram tanto correlações positivas quanto negativas entre a morfometria e a população neuronal. Enquanto no grupo VN a densidade da camada granular correlacionou-se positivamente com o índice de atrofia, no grupo AL tanto a densidade como a área de NeuN correlacionaram-se positivamente com o volume hipocampal e a área de NeuN com a área hipocampal coronal. Apesar de outros trabalhos terem evidenciado correlações entre a população granular e a volumetria hipocampal (Briellmann *et al.*, 2002; Diehl *et al.*, 2002), esta camada ocupa pouca área hipocampal ao nível do corpo do hipocampo e, assim, sua correlação pode não ser realmente significativa. O mesmo pode ser dito sobre a correlação observada em CA2 no grupo VN, uma das menores subregiões hipocampais, e no prosúbulo do corpo do hipocampo no grupo AG, também uma região pequena. Ainda, a densidade neuronal na camada granular pode ser reduzida não apenas pela perda neuronal, mas também pela dispersão das células granulares (Mathern *et al.*, 1997). O subículo apresentou correlações negativas com a volumetria hipocampal tanto no grupo VN quanto no grupo AG. Esta região, apesar de ser a maior da formação hipocampal, apresentou pouca alteração na densidade neuronal e, portanto, sua correlação também pode ser não significativa para o volume hipocampal. Em duas outras regiões com peso sobre o volume hipocampal, CA4 e CA1, encontramos correlações nos

grupos AL e AG, respectivamente. No grupo AL, CA4 correlacionou-se positivamente com o índice de atrofia. Já na região CA1 do grupo AG houve correlação negativa da população neuronal com o volume hipocampal, contrário aos achados dos outros estudos (Van Paesschen *et al.*, 1997; Diehl *et al.*, 2002; Diehl *et al.*, 2004). Uma explicação para esta correlação negativa pode ser o encolhimento tecidual com a atrofia, que pode ter aumentado artificialmente a densidade neuronal neste grupo.

Apesar das correlações entre a população neuronal e características morfométricas hipocampais, não foi observada diferença significativa entre o grupo com volume normal e os com algum grau de atrofia. Alguns trabalhos observaram pacientes sem atrofia na RNM que, entretanto, apresentavam esclerose hipocampal. Jackson e colaboradores (1994) reportaram seis pacientes sem atrofia hipocampal na RNM, tanto em avaliação qualitativa quanto quantitativa. Todos apresentavam perda neuronal, definida qualitativamente, que poderia chegar a até 50% em CA1 e CA3, além de gliose. Kuzniecky e colaboradores (1997) observaram esclerose hipocampal em pacientes com volume normal na RNM, sendo que volume hipocampal normal foi observado mais na avaliação quantitativa (14% dos casos) do que no diagnóstico visual (3%). Lamusuo e colaboradores (2001) observaram, em sua casuística, 31% de pacientes sem alterações na RNM, tanto na volumetria nas sequências ponderadas em T1 quanto na relaxometria em T2. Em todos estes pacientes com RNM normal foi observado algum grau de atrofia na avaliação histológica qualitativa. Garcia e colaboradores (1994) observaram volume normal na avaliação visual de RNM em 39% de sua casuística, todos com esclerose hipocampal na avaliação patológica. Esta esclerose foi, entretanto, mais leve quando comparada a esclerose de pacientes com atrofia vista na RNM. Salanova e colaboradores (1999) observaram que, de nove pacientes jovens com esclerose hipocampal na histologia, apenas seis foram diagnosticados com atrofia hipocampal em imagens ponderadas em T2. Estes dados e os nossos indicam que pacientes com epilepsia do lobo temporal com volume hipocampal normal podem apresentar perda neuronal, tão grave quanto pacientes com atrofia hipocampal na RNM. Ademais, os dados da avaliação patológica por profissionais do Serviço de Patologia do HC de Ribeirão Preto corroboram a homogeneidade que observamos em relação à perda neuronal na ELTM.

## **5.2. População Glial**

A astrogliose, avaliada pela área imunopositiva para a proteína GFAP, foi um achado observado em todas as regiões do hipocampo dos pacientes com ELTM, e na fascia dentata e

CA4 em pacientes com epilepsia extratemporal (TD). A gliose é uma resposta padrão a danos, de várias naturezas, que atingem o sistema nervoso central. Em sua gênese, após perda neuronal, astrócitos sofrem hipertrofia e finalmente hiperplasia, ocupando a região injuriada (Fawcett e Asher, 1999). Nesta região, forma-se uma rede altamente emaranhada de prolongamentos interligados por junções comunicantes. Esta reação pode ser importante para conter a reação inflamatória causada pela degeneração tecidual (Silver e Miller, 2004; Yiu e He, 2006). Em pacientes com ELT, a gliose é um achado frequentemente associado à morte neuronal hipocampal, definindo, junto da última, o quadro de esclerose hipocampal (Proper *et al.*, 2001; Swartz *et al.*, 2006; Prayson e Yoder, 2007). Assim como na gliose vista em injúrias do sistema nervoso, na esclerose hipocampal a gliose é caracterizada por um emaranhado de fibras (Martinian *et al.*, 2009) e, em casos com displasia cortical, até mesmo as células baloniformes são de difícil delimitação neste emaranhado. Esta dificuldade em delimitar as células pela grande sobreposição de prolongamentos GFAP+ nos estimulou a avaliar a gliose pela quantificação do GFAP ao invés de contagens de corpos celulares. Ainda, a densidade apenas refletiria a hiperplasia associada à reação glial. Uma vez que a hipertrofia é o principal componente desta reação (Khurgel e Ivy, 1996; Menet *et al.*, 2003; Silver e Miller, 2004) e que a densidade apenas avaliaria a hiperplasia astrocitária, a quantificação é o método mais ideal de análise. Van Paeschen e colaboradores (1997) comentam que a quantificação de GFAP deve correlacionar-se melhor com o grau de gliose do que a densidade astrogliol.

Alguns trabalhos indicam que os astrócitos teriam ação na gênese das crises. Vessal e colaboradores (2005) observaram, em modelo de abrasamento, redução de crises comportamentais em animais tratados com astrotóxina L- $\alpha$ -aminoadipato. Dentre os mecanismos pelos quais os astrócitos poderiam participar da gênese das crises temos a alteração da homeostase do potássio (McNamara, 1994; Borges *et al.*, 2003), no ciclo de recaptação do glutamato (Khurgel e Ivy, 1996; Drage *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2003; Binder e Steinhauser, 2006; Chakir *et al.*, 2006), pelo aumento da expressão de adenosina kinase (Fedele *et al.*, 2005). Além destas alterações, o fato de os astrócitos formarem grandes redes conectadas por junções comunicantes parece ser importante para a gênese das crises (Wong, 2009). Contrapondo-se a estes efeitos deletérios dos astrócitos por meio das crises, animais *knockout* para a proteína ácida fibrilar glial submetidos a *status* por ácido cáinico apresentam crises mais graves e maiores danos neuronais do que os animais com expressão normal (Otani *et al.*, 2006). Esta proteína é importante para o processo de ativação dos

astrócitos (Menet *et al.*, 2003) e os animais animais *knockout* parecem ter mais defeitos na barreira hematoencefálica, prolongamentos mais curtos e falhas no funcionamento normal (Otani *et al.*, 2006).

A maioria dos trabalhos sobre astrocitose em epilepsia focam principalmente correlações com a morte neuronal ou com excitabilidade tecidual. Nos trabalhos que avaliam sua correlação com neuroimagem, a astrogliose é correlacionada a alterações em imagens ponderadas em T2. Sua contribuição sobre a volumetria hipocampal, entretanto, é pouco estudada. Van Paeschen e colaboradores (1997) e Kuzniecky e colaboradores (2001) imputaram contribuição da gliose na volumetria. Porém, como esta contribuição estava associada à contribuição de neurônios, pode-se argumentar que esta última população, e não os astrócitos, possuía real peso sobre a volumetria. Erickson e colaboradores (2009) não conseguiram correlacionar a população de astrócitos reativos com valores de MBV de córtex de pacientes com ELT. Em um estudo com metodologia de avaliação e análise mais semelhante ao nosso, Briellman e colaboradores (2002) avaliaram imagens em volumetria e relaxometria em T2 com quantificações de neurônios e glias, porém observaram correlação apenas entre a população glial na camada granular e imagens em T2. Nossos dados apenas revelaram correlação negativa fraca entre a população de astrócitos reativos e o volume hipocampal no grupo ELTM, indicando que a população astrogliosa é mais ativada quanto mais grave for a perda volumétrica.

Encontramos correlações indicativas de que o grau de reação astrogliosa é proporcional ao grau de perda neuronal. Estas correlações são semelhantes aos achados de Crespel e colaboradores (2002), onde a gliose foi grave em CA1, região de perda neuronal grave, e ocorreu na camada subgranular e hilo dos pacientes que apresentavam perda neuronal em CA4. Khurgel e Ivy (1996) discutem que danos neuronais promovem a gliose. A homogeneidade da morte neuronal deve ser o fator que explica tanto a homogeneidade da resposta glial quanto a estreita ligação entre seu grau e o grau da perda neuronal.

Uma das regiões com maior grau de astrogliose foi a região subgranular. Nesta região, Kralic e colaboradores (2005) observaram, em modelos de crise por ácido cáinico, proliferação astrogliosa no lado onde ocorreu a gênese das crises e Kang e colaboradores (2006) descreveram aumento de vimentina, marcador de astrócitos imaturos. Por esta região ser constituída por células progenitoras (Gould *et al.*, 1997; Gould *et al.*, 1999), o aumento de GFAP nesta área poderia ser resultado de divisão celular promovida pelas crises, como descrito por Kang e colaboradores (2006). No subículo, apesar de não ser observada perda

neuronal, houve aumento de astrócitos reativos. Esta alteração deve ser fruto das crises epiléticas, que podem promover reação glial mesmo sem ocorrência de morte neuronal (Khurgel e Ivy, 1996; Drage *et al.*, 2002).

A avaliação da população de micróglia ativadas, pela expressão do antígeno leucocitário humano HLA-DR, mostrou que os casos ELTM (VN, AL e AG) apresentam ativação microglial em todas as regiões da formação hipocampal avaliadas, exceto no hilo, onde apenas o grupo AL apresentou aumento, e no subículo, onde o aumento foi observado no grupo AG. De acordo com a literatura (Drage *et al.*, 2002; Bonde *et al.*, 2006) as micróglia, ao serem ativadas, passam de um estado com pouca ramificação para um estado hiper-ramificado, tornando-se finalmente amebóides. Não observamos, entretanto, micróglia com este formato final exceto em uma única região de um único caso. Wirenfeldt e colaboradores (2009) observaram, em casos de encefalite de Rasmussen, micróglia morfológicamente semelhantes às encontradas neste estudo, sem a presença de fagócitos no tecido. Boer e colaboradores (2006) também observaram que, em casos de ELT com displasia cortical, as micróglia reativas raramente eram fagócitos. Um possível motivo para esta ausência de fagócitos é o fato de a patologia estar na sua etapa crônica, onde a morte neuronal já não é mais detectada. Durante a avaliação da marcação para HLA-DR foram observados alguns neurônios levemente marcados pelo anticorpo em vários dos casos de ELT avaliados, mas não em casos do grupo Ctrl. Hollister e colaboradores (1997) observaram presença do antígeno HLA-DR em neurônios em CA1 e no córtex entorrinal de 14% dos casos de Doença de Pick que avaliaram. Estes neurônios, ao contrário dos observados neste trabalho, apresentavam marcação tão forte quanto a microglial. Ainda não se sabe, entretanto, qual seria a função desta expressão neuronal. Quanto ao grupo TD, apenas na camada molecular externa houve ativação significativa, em relação ao grupo Ctrl, em concordância com achados de Wirenfeldt e colaboradores (2009), que mostraram que a ativação microglial na displasia é menos evidente do que em casos de encefalite de Rasmussen, e de Hildebrandt e colaboradores (2005), que não encontraram aumento na ativação microglial em casos de displasia.

O fato de a ativação microglial manter-se em uma condição onde praticamente não há mais morte celular aponta para uma ação das micróglia sobre a excitabilidade tecidual. Ao serem ativadas, as micróglia aumentam a produção de várias moléculas pró-inflamatórias,

antiinflamatórias e receptores (Lee *et al.*, 2002), e vários trabalhos indicam ligação entre citocinas produzidas pelas micróglia e as características das crises em epilepsia. Notadamente, a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) é ligada à redução da latência para crises e à frequência destas em vários modelos animais (Vezzani *et al.*, 2000; Ravizza *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2006). Outra interleucina importante, IL-6, apresenta efeitos contraditórios sobre as crises, sendo ligada à proteção de danos e redução da susceptibilidade a crises com cainato (Penkowa *et al.*, 2001) ou ao aumento da mortalidade e severidade de crises em status por PTZ (Kalueff *et al.*, 2004). Em pacientes com epilepsia, trabalhos correlacionaram a duração da epilepsia e frequência das crises com ativação microglial em casos de tumor e displasia (Boer *et al.*, 2006; Choi e Koh, 2008; Choi *et al.*, 2009). Wirenfeldt e colaboradores (2009), entretanto, demonstraram que a quantidade de micróglia ativadas não é um mero efeito da duração da epilepsia ou da severidade das crises, o que indica que podem ser parte importante no processo epileptogênico.

Em modelos de ELT, a ativação microglial inicia-se imediatamente após um insulto (Jansson *et al.*, 2009), precedendo a morte neuronal e a reação astrogliar, e é apontada como importante para ativar os astrócitos (Choi e Koh, 2008). Embora Benkovic e colaboradores (2006) mostrarem que a população microglial ativada volta rapidamente ao estado basal, outros trabalhos indicam que elas podem permanecer ativadas, mesmo em menor quantidade, por tempo mais prolongado (Jansson *et al.*, 2009; Kirkman *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010). Ainda, micróglia ativas são encontradas em hipocampos de pacientes farmacorresistentes submetidos à cirurgia para controle das crises e também são vistas em vários processos cerebrais crônicos (Beach *et al.*, 1995; Boer *et al.*, 2006; Chakir *et al.*, 2006; Block *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2009).

Uma vez que modelos experimentais mostram que a microgliose dissipam-se após o *status* (i.e., logo após a IPI), é provável que as micróglia reativas encontradas no tecido epileptogênico crônico sejam um produto dos insultos promovidos pelas crises recorrentes (por insultos entendam-se alterações na homeostase do tecido, independente da ocorrência de morte neuronal). Em concordância com esta ideia, Kauppinen e colaboradores (2008) mostraram que baixas concentrações de Zn são capazes de ativar micróglia. Como as

concentrações utilizadas neste estudo são 10 vezes inferiores às postuladamente liberadas durante as crises (Frederickson *et al.*, 2004), as crises epiléticas são um provável motivo para a presença de micróglia ativadas no tecido crônico. Ainda, nesta situação crônica, a presença de micróglia reativas pode ser mais relacionada à excitabilidade encontrada no tecido epileptogênico do que à fagocitose de neurônios mortos, uma vez que o período onde ocorre a maioria da morte neuronal já passou.

Dos trabalhos com imagem, o estudo da micróglia geralmente é feito com tomografia por emissão de pósitrons (PET) com  $^{11}\text{C}$ -PK11195, um marcador de micróglia ativada. Em encefalopatia, Kumar e colaboradores (2008) observaram microgliose e astrogliose em regiões marcadas no PET, enquanto a RNM não revelou quaisquer alterações teciduais. Banati e colaboradores (1999) observaram aumento de marcação em pacientes com encefalite de Rasmussen, mas não em esclerose hipocampal. Ainda, o padrão de marcação no PET só coincidiu parcialmente com as alterações vistas na RNM. Na histologia, havia micróglia ativadas nas regiões com marcação no PET. Wolf e colaboradores (2002), em trabalho com volumetria em RNM feita em ratos Sprague-Dawley submetidos a status por cainato, observaram que os dados da patologia, principalmente densidade neuronal, correlacionam-se bem com a volumetria. Como eles viram que a ativação microglial foi mais intensa onde houve perda mais severa, seria esperada correlação negativa entre microgliose e volumetria. Estes autores, porém, não realizaram teste estatístico de correlação, portanto não é possível afirmar com segurança que a aparente associação entre as variáveis por eles estudadas seja observada estatisticamente. Ainda observaram hipersinal na RNM não acompanhada de astrogliose, apontando como causa para este hipersinal a ativação microglial. Na atual casuística, a área de HLA-DR correlacionou-se negativamente com características morfométricas no grupo com manutenção do volume hipocampal e positivamente nos grupos com perda de volume hipocampal. Algumas destas associações foram vistas em subcampos que ocupam grande parte do hipocampo (i.e., CA4, CA1, subículo). Como tanto a ativação microglial como a astrogliose podem ser afetados pelas crises, esta heterogeneidade vista em ambos pode ser resultante do efeito da frequência de crises sobre a ativação das glia, o que

confundiria qualquer efeito destas populações sobre a volumetria hipocampal nos pacientes com ELT.

No grupo controle e no grupo TD, onde não há preservação da densidade neuronal em praticamente todo o hipocampo, observamos correlações positivas entre as populações neuronal e microglial, o que indica que estas correlações são as esperadas no tecido inalterado. Em contrapartida, nos grupos ELTM, estas populações apresentaram correlações negativas, indicando que a reação microglial é mais intensa quanto maior for a morte neuronal. Esta correlação negativa em casos com morte neuronal é semelhante à observação de Wolf e colaboradores (2002). O mesmo balanço positivo foi encontrado entre as populações microglial e astrogial nos grupos Ctrl e TD. No grupo ELTM, onde houve maior ativação astrogial, estas correlações positivas reduzem-se à apenas uma região, indicando que as glias perdem as relações observadas no tecido inalterado. Apoiando esta conclusão, no grupo TD, foram observadas correlações negativas apenas em regiões onde a marcação de GFAP era significativamente maior que a do grupo controle.

### **5.3. Metalotioneínas I/II**

Nos grupos ELTM, observamos aumento significativo da área imunorreativa para metalotioneínas I/II em relação aos valores do grupo controle. O número de regiões onde ocorreu aumento da área foi maior de acordo com o grau de atrofia hipocampal, sendo 8 das 11 regiões avaliadas apresentando alteração no grupo com atrofia grave, 5 das 11 no grupo atrofia leve e 5 das 11 no grupo com volume normal. A camada subgranular, o hilo e a região CA1 foram as regiões onde o aumento foi observado nestes três grupos. As camadas granular e molecular interna não apresentaram alterações em nenhum destes grupos. As regiões que possuem neurônios piramidais (Corno de Amon, prosubículo e subículo) dos grupos com algum grau de atrofia hipocampal foram mais afetadas do que as do grupo com volume hipocampal normal (6 de 6 nos grupos com atrofia e 3 de 6 nos grupos com volume normal). No grupo TD, o aumento desta proteína foi restrito às camadas moleculares e subgranular da *fascia dentata*.

As MT-I/II são expressas em conjunto, principalmente em astrócitos e, segundo alguns trabalhos, em menor proporção em neurônios. Elas correspondem à mais de 60% das MT no cérebro (Chung e West, 2004). A marcação de MT-I/II de nosso trabalho corroborou ambas as

localizações, porém apenas pudemos detectar MT em neurônios de alguns poucos pacientes do grupo Ctrl. Chung e colaboradores (2008) mostraram que as MT-I/II são primariamente produzidas em astrócitos, que as liberam no meio extracelular, de onde podem, através do receptor megalina, entrar em neurônios. Deste modo, não podemos garantir que a marcação existente nos neurônios seja endógena deste tipo celular. Como as MT podem ser secretadas no meio extracelular (Chung e West, 2004; Chung *et al.*, 2008) decidimos realizar a avaliação desta proteína por área imunorreativa ao invés de contagem de células positivamente marcadas pelo anticorpo anti-MT.

A expressão das MT pode ser induzida por vários fatores, como metais (Ebadi *et al.*, 1995; Penkowa *et al.*, 2001; Takeda, 2001), agentes oxidativos (Andrews, 2000), moléculas inflamatórias (Ebadi *et al.*, 1995; Penkowa *et al.*, 2001; Takeda, 2001) e glicocorticóides (Ebadi *et al.*, 1995; Takeda, 2001). Sua principal função é o controle dos níveis de Zn livres nas células (Aschner *et al.*, 1997), seja captando o excesso ou transportando-o para as mitocôndrias (Colvin *et al.*, 2003). Além desta função, podem ajudar na detoxificação de metais pesados (Goering e Klaassen, 1983; Goering e Klaassen, 1984), na proteção contra estresse oxidativo (Dunn *et al.*, 1987; Hidalgo, 2004), na proteção contra a carcinogênese (Cherian *et al.*, 1993; Cherian *et al.*, 1994). Muitos trabalhos indicam que os aumentos das MT em diversos modelos de trauma do SNC são transitórios, durando de horas a dias após o insulto inicial (Pazdernik *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Chung e West, 2004). Estudos em modelos experimentais de epilepsia focam as alterações nas MT-I/II no período logo após a injúria precipitante inicial, no início do processo de epileptogênese (Penkowa *et al.*, 2001; Pazdernik *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Porém, alterações dos níveis basais de MT foram observadas em várias patologias crônicas do sistema nervoso central, como mal de Alzheimer (Carrasco *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2006), doença de Pick (Hidalgo, 2004), mal de Parkinson (Ebadi *et al.*, 2005), isquemia cerebral focal (van Lookeren *et al.*, 1999), esclerose lateral amiotrófica (Ebadi *et al.*, 2005) e em encefalopatia espongiiforme bovina (Hanlon *et al.*, 2002). Aplicação de MT-I/II promoveu melhoras em modelos de esclerose múltipla, encefalite auto-imune e trauma cerebral (Hidalgo, 2004). Em modelos crônicos de epilepsia ou em pacientes não há, até o momento, nenhum trabalho investigando alterações na expressão das MT.

Os estudos em modelos experimentais de epilepsia indicam aumento das MT-I/II após crises, mostrando ainda um papel protetor destas quanto ao dano celular. Modelos de *status* induzido por ácido cáinico em camundongos knockout para MT-I/II (Carrasco *et al.*, 2000) e

animais que apresentam redução dos níveis de MT-I/II em decorrência de falta de produção de IL-6 (Penkowa *et al.*, 2001) demonstraram aumento da apoptose e de danos neuronais, redução da ativação microglial e astrogial e aumento de marcadores de estresse oxidativo, comparados com animais com expressão normal desta proteína. De modo complementar, Penkowa e colaboradores (2005) observaram que animais com sobre-expressão de MT-I/II submetidos ao *status* por ácido cáinico apresentam menor ativação microglial, produção de interleucinas, redução dos danos inflamatórios e de agentes antioxidantes, redução de apoptose e aumento da ativação astrogial e de fatores de crescimento em comparação com animais com expressão normal submetidos ao mesmo tratamento. Em *status* induzido por Soman em ratos (Pazdernik *et al.*, 2001) foram observados aumento dos níveis de mRNA e de proteína MT-I/II, principalmente nas regiões que sofreram mais danos, o que indica que estas proteínas podem refletir o grau de injúria sofrida pelo tecido. Do mesmo modo, Montpied e colaboradores (1998) observaram aumento de MT-II no hipocampo após crises por injeção de ácido cáinico na amígdala. Ainda em epilepsia, a expressão de MT-I/II seria importante na regulação do gene PTZ17, ligado a crises induzidas quimicamente (Miura e Naganuma, 2000).

Nossos dados indicam aumento das MT em várias regiões em pacientes com ELTM farmacorresistente, corroborando a participação das MT em processos crônicos. Os estudos sobre as isoformas I e II são consensuais em ligar o aumento destas à maior proteção de danos no tecido. A ausência de aumento que observamos nas camadas granular e molecular interna pode ser pelos melhores mecanismos de controle do Zn que as células granulares possuem, uma vez que devem lidar com altas concentrações de Zn, estocando-o em vesículas glutamatérgicas de seus terminais sinápticos (Wenzel *et al.*, 1997; Cole *et al.*, 1999). Os danos observados em CA3 podem ser resultado da liberação de Zn das fibras musgosas com as crises (Frederickson *et al.*, 1989; Perez-Clausell, 1996; Frederickson *et al.*, 2000), que podem rapidamente depletar os estoques vesiculares neuronais (Frederickson *et al.*, 2004). Outras fibras na formação hipocampal também apresentam vesículas de Zn, mesmo que em concentração inferior à apresentada pelas fibras musgosas. Takeda e colaboradores (2006) indica que até 45% das colaterais de Schaeffer possuem vesículas de Zn. Fibras do córtex entorrinal, que, em menor grau, aferentam quase todas as regiões da formação hipocampal, também possuem Zn em suas sinapses (Amaral e Lavenex, 2006). Mesmo sem o zinco vesicular, o aumento das MT-I/II pode estar ligado ao controle das outras fontes de Zn celular, que também podem ser responsáveis por dano celular (Frederickson *et al.*, 2004). Neste

grupo, entretanto, não observamos correlações entre os níveis de MT e a densidade neuronal ou área imunopositiva para NeuN, GFAP e HLA-DR. Uma provável razão para esta falta de ligação é a grande homogeneidade da perda, independente do volume hipocampal, bem como a grande homogeneidade da reação glial. Concordante com estes resultados, apenas o grupo AL apresentou correlações negativas entre a área de MT em CA2 e prosúbicula e o índice de atrofia e positiva entre o volume do corpo do hipocampo e a área de MT em CA3. Estas correlações ocorreram em regiões de pouco peso sobre o volume hipocampal e por serem vistas correlações apenas em um grupo de ELTM indicam que não há correlação entre a volumetria hipocampal e os níveis de MT. Novamente, a grande homogeneidade de alterações patológicas no grupo ELTM pode ser o principal fator para esta falta de correlação.

Especificamente no grupo TD, as alterações nas MT restringiram-se às camadas moleculares e subgranular da *fascia dentata*. Este aumento significativo da expressão ocorreu em áreas ligadas à principal via aferente do hipocampo, a via perfurante. Em macacos, esta via faz sinapses nas camadas moleculares e possui Zn em suas sinapses (Amaral e Lavenex, 2006). Com a evolução da epilepsia, ocorre a reorganização dos axônios das células granulares, que passam a realizar sinapses principalmente com axônios apicais das células granulares na camada molecular interna (Babb *et al.*, 1984; Sutula *et al.*, 1989; Babb *et al.*, 1991), mas também em partes da camada molecular externa (Babb *et al.*, 1996) e em dendritos basais na camada subgranular e mesmo no hilo (Shapiro *et al.*, 2008). Apesar de o aumento ser detectado apenas nestas poucas áreas hipocâmpais, foram observadas correlações positivas entre o aumento dos níveis das MT e a densidade neuronal neste grupo. O maior número de correlações foi entre a área de NeuN em CA4 e os níveis de MT em várias outras regiões hipocâmpais. Como em CA4, uma região vulnerável à perda neuronal, a população neuronal foi preservada, esta proteção pode ser um efeito dos níveis de MT, principalmente nas regiões subgranular e hilo. Apenas neste grupo foram observadas correlações entre as populações gliais e as MT, indicando pouca ligação entre a quantidade de células e a produtividade de MT. Como nos grupos Ctrl e ELTM não foram observadas correlações entre estas populações e as MT, a despeito da grande alteração em todas as populações celulares no último agrupamento, pode-se postular que aumento da expressão de MT é mais um evento funcional que estrutural (i.e. está mais ligado à produtividade celular do que à quantidade de células produzindo). A contagem das células imunopositivas para MT seria um modo de tentar corroborar esta possibilidade.

Além de sua importância na homeostase do zinco, alguns trabalhos ligam as MT ao controle de radicais livres, participando de processos de controle do estresse oxidativo (Chubatsu e Meneghini, 1993; Andrews, 2000; Maret, 2000; Formigari *et al.*, 2007). Entretanto, ainda é debatido se a atuação das MT como antioxidantes ocorre diretamente ou pela liberação de Zn em condições de estresse oxidativo (Maret, 2000; Formigari *et al.*, 2007). Chubatsu e Meneghini (1993) discutem que as MT tem maior eficiência na proteção de danos ao DNA do que no controle do estresse oxidativo geral, impedindo, com uma eficiência até 800 vezes maior que a glutatona, a ligação de radicais hidroxila ao DNA. Além de possuírem regiões estimuladas por metais, a região promotora dos genes da MT apresenta sítios sensíveis a agentes oxidantes (Andrews, 2000), o que fortalece a ligação desta proteína ao controle do estresse oxidativo. Devido ao seu papel no controle do estresse oxidativo, podemos esperar que pelo menos parte da proteção conferida pelas MT ocorra pelo controle de radicais oxidativos.

Alguns estudos com outra isoforma existente no SNC indicou efeitos deletérios para o aumento de MT. Estudos em camundongos *knockout* para MT-III mostram que a ausência desta proteína torna a região CA1 mais protegida de morte neuronal causada por crises induzidas com ácido cáinico (Cole *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003), indicando que esta proteína poderia contribuir com danos causados pelas crises epiléticas. Palumaa e colaboradores (2005) observaram que as isoformas I e II tem maior afinidade por Zn, enquanto a III é mais plástica e possui ligação mais fraca e maleável a este metal. Esta ligação mais fraca com o Zn deve ser o principal motivo para sua liberação da MT-III durante crises. Como a ligação com as MT-I/II é mais estável, o aumento da imunorreatividade observada em nosso estudo deve estar ligada à proteção de danos celulares, tanto controlando o Zn como estresse oxidativo, antes do que desempenhando um papel de agravamento destes danos.

#### **5.4. Aquaporina 4**

Observamos redução da área imunopositiva para AQP4 na camada subgranular, hilo, CA4 e CA1 dos pacientes com ELT. Esta redução, todavia, não foi homogênea em todos os grupos. Esta alteração ocorreu principalmente na AQP4 perivascular, uma vez que o endotélio dos vasos nos casos de ELT apresentou definição ainda maior de sua marcação em relação ao grupo Ctrl. Observamos, ainda, uma tendência ao maior escurecimento de toda a área tecidual nos grupos ELT, indicando que, com a perda de polarização, a AQP4 passou a ocorrer em toda a membrana astrocítica. Este padrão de alteração foi observado por Amiry-Moghaddam e

colaboradores (2003), em animais knockout para  $\alpha$ -sintrofina, proteína responsável pela polarização da AQP4 na membrana astrocítica perivascular. Nestes animais, a AQP4 perde sua localização perivascular e passa a ocupar toda a superfície astrocítica, enquanto a AQP4 endotelial mantém seu padrão. Quanto à maior definição de AQP4 endotelial, Kim e colaboradores (2009) observaram, em ratos Sprague-Dawley submetidos a crises por pilocarpina, maior imunoreatividade em vasos sem a colocalização com GFAP, indicando aumento da AQP4 vascular na ELT.

Em pacientes com ELT e esclerose hipocampal foi observado aumento dos níveis de AQP4, na avaliação por Western Blot (Lee *et al.*, 2004; Eid *et al.*, 2005). Apesar deste aumento, Eid e colaboradores (2005) observaram redução da imunomarcção, vista em microscopia eletrônica, nos processos astrocíticos perivasculares nestes pacientes. Esta redução, observada em CA1, foi de 44% dos valores do grupo controle. Observamos redução de 58% da concentração de AQP4 perivascular nesta região de pacientes com atrofia hipocampal grave. Além deste achado, também observamos redução de área imunopositiva em outras regiões dos outros grupos. Entretanto, a redução observada na presente casuística foi apenas em relação ao grupo controle, não ao grupo TD, que é semelhante ao controle utilizado nesses dois trabalhos. É possível que estes trabalhos encontrassem ainda mais alterações se a comparação fosse com pacientes sem quaisquer alterações neurológicas.

A despeito de sua importância na homeostase da água, que poderia influenciar no grau de hidratação tecidual e, por isto, no volume hipocampal, nenhum trabalho até o momento tentou avaliar a influência desta proteína no volume hipocampal. Os trabalhos com animais focam principalmente na sua ligação com a excitabilidade tecidual, por seu acoplamento à homeostase de íons presentes no EEC, principalmente  $K^+$  (Amiry-Moghaddam *et al.*, 2003; Binder *et al.*, 2006). Não conseguimos, entretanto, correlacionar a área perivascular imunopositiva para AQP4 a quaisquer das características morfométricas hipocampais avaliadas.

A importância desta redução para a preservação ou degradação tecidual depende do tipo de edema associado à epilepsia, uma vez que estudos mostraram que a AQP4 piora o edema citotóxico mas ajuda na dissipação do edema vasogênico (Papadopoulos *et al.*, 2004; Papadopoulos e Verkman, 2005; Wang *et al.*, 2006). Van Vliet e colaboradores (2007) observaram quebra da barreira hematoencefálica em humanos com ELT e ratos após *status* por estimulação elétrica. Nos ratos crônicos, a abertura da barreira correlacionou-se positivamente com a frequência de crises. Estes dados indicam que o edema vasogênico é um

componente importante na ELT e que a perda de polaridade da AQP4 deixaria o tecido mais vulnerável aos danos causados por este tipo de edema. Segundo dados de Binder e colaboradores (2004), após a aplicação de glutamato e após crises induzidas por PTZ, ocorre redução do coeficiente de difusão aparente (ADC), semelhante ao ocorrido em intoxicação por água, indicando que o edema citotóxico também pode ocorrer nas crises. Modelos de isquemia mostram que logo no período inicial ocorre edema citotóxico, porém mais tardiamente o edema vasogênico apareceria (Papadopoulos e Verkman, 2007). Camundongos knockout para  $\alpha$ -sintrofina, proteína importante para a polarização da AQP4, submetidos a intoxicação por água apresentam redução do ADC mais lenta do que nos animais selvagens, porém a amplitude final da redução é a mesma (Amiry-Moghaddam *et al.*, 2003). Deste modo, mesmo sendo postulado que a redução de AQP4 protege mais os animais deste tipo de edema, é possível que ela apenas retarde os danos.

Em suma, a redução perivascular da AQP4 poderia piorar os danos teciduais, tanto por não conseguir conter o edema citotóxico quando mantendo por mais tempo o edema vasogênico. Em concordância, observamos que, em pacientes com ELT, quanto mais próximo dos níveis do grupo controle for a área perivascular imunopositiva para AQP4 maior é a densidade neuronal, sugerindo que a manutenção da polaridade é importante para a preservação tecidual em ELT.

### **5.5. Moléculas de matriz extracelular**

A área imunopositiva para condroitin sulfato estava aumentada em várias regiões nos grupos ELTM em comparação com o grupo controle. Este aumento esteve quase exclusivamente dentro dos grupos com volume inalterado ou pouco alterado, com aumento em 7 das 11 regiões no grupo VN e 4 das 11 no grupo AL, em comparação com apenas uma área apresentando aumento significativo no grupo AG. Outra alteração observada foi a marcação de CS em astrócitos, que só foi observada nos grupos ELTM, principalmente na região CA1, enquanto a marcação neuronal foi observada em todos os grupos analisados. A literatura descreve a expressão de CS tanto principalmente por neurônios e astrócitos, mas também por micróglias e células precursoras de oligodendrócitos (Sykova, 2004; Crespo *et al.*, 2007; Pantazopoulos *et al.*, 2010), confirmando nossos achados. O anticorpo contra CS-56 é descrito como reconhecedor de epítipo que ocorre em algumas, mas não todas as cadeias de CS (Fawcett e Asher, 1999) e até o momento não se sabe exatamente quais tipos de CSPG são

reconhecidas por ele. Mesmo assim, este anticorpo é amplamente utilizado em estudos sobre CS no SNC (Roitbak e Sykova, 1999; Huang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2009).

Os proteoglicanos de condroitin sulfato (CSPG) são glicoproteínas compostas por núcleo protéico ao qual se ligam cadeias de polissacarídeos sulfatados covalentemente nos resíduos de serina (Crespo *et al.*, 2007). Os polissacarídeos, por sua vez, são compostos por uma base de tetrassacarídeo de ligação à proteína, seguida por uma cadeia repetida de dissacarídeo de ácido glicurônico (GluA) e N-acetil-galactosamina (GalNAc) sulfatados. De acordo com a posição do sulfato no açúcar define-se o tipo de cadeias de CS, sendo que os condroitin sulfato tipo A apresentam sulfatação no carbono 4 da GalNAc, os tipo C no carbono 6 da GalNAc, os tipo D nos carbonos 6 de GalNAc e 2 de GluA e os tipo E nos carbonos 4 e 6 de GalNAc (Crespo *et al.*, 2007). Estas cadeias são importantes por ligarem-se a várias moléculas, como fatores de crescimento e moléculas reguladoras dos neuritos (Shimazaki *et al.*, 2005; Crespo *et al.*, 2007) e, segundo alguns autores, elas são as responsáveis pelas características inibitórias ao crescimento axonal de alguns CSPG (Smith e Strunz, 2005; Huang *et al.*, 2006; Crespo *et al.*, 2007).

. Várias moléculas de diferentes categorias podem estimular a produção de CSPG no SNC, dentre elas os neurotransmissores glutamato e GABA (Pantazopoulos *et al.*, 2010), IL-1 $\beta$  (Smith e Strunz, 2005) e fatores de crescimento como EGF e TGF- $\beta$ 1 (Stichel *et al.*, 1995; Smith e Strunz, 2005; Yin *et al.*, 2009). Yin e colaboradores (2009) indicam que tanto EGF quanto TGF- $\beta$ 1, mas não IL-1 $\beta$ , estimulam as enzimas CS Sintase-1 e C6ST-1, que atuam na síntese de CS. Observaram ainda que TGF- $\beta$ 1 é mais eficiente que EGF e, *in vivo*, há aumento de TGF- $\beta$ 1 e bFGF, mas não de EGF após injúria cortical. Segundo Smith e Strunz (2005), o efeito de EGF sobre a produção de CS é maior se este for combinado com outros fatores de crescimento e EGF estimula principalmente a produção de fosfocan enquanto TGF- $\beta$ 1 estimula neurocan, que são os principais CSPG no SNC (Okamoto *et al.*, 2003; Crespo *et al.*, 2007). As principais células ligadas ao aumento de produção de CSPG após alguma injúria são os astrócitos e micróglia (Fawcett e Asher, 1999; Yin *et al.*, 2009). Segundo Yin e colaboradores (2009), o bFGF que é produzido após injúria cortical estimularia a ativação de astrócitos, que por sua vez produziriam TGF- $\beta$ 1, que estimularia as micróglia a produzirem

CSPG e mais bFGF, criando um via de feedback entre estes tipos celulares. Na injúria, o aumento destes dois tipos celulares correlaciona-se com o aumento de CSPG (Yin *et al.*, 2009).

Nossas avaliações indicaram que tanto a população microglial como a astroglial correlacionam-se positivamente com os níveis de CSPG tanto no grupo Ctrl quanto no grupo TD. Entretanto, no grupo ELTM não foram observadas correlações fortes entre a população astroglial ativada e a área de CS, enquanto houve grande número de correlações entre a população microglial ativada e a área de CS. Como foi observado um grande aumento no número de correlações entre micróglia e CS no grupo ELTM, podemos imaginar que há um fortalecimento das relações já observadas nos casos Ctrl e TD, onde há menos alterações patológicas no hipocampo. Apesar da falta de correlações fortes entre GFAP e CS, observamos algumas correlações positivas fracas entre estas populações nos grupos ELTM, sendo que estas correlações não foram relatadas por estarem dentro de nossos parâmetros de corte (i.e.,  $|r| < 0,4$ ). Quando observadas dentro dos grupos ELTM (VN, AL e AG), foram observadas algumas correlações positivas fortes entre GFAP e CS (dados não exibidos). É possível que isto ocorra por as correlações ocorrerem entre regiões diferentes em cada grupo, impedindo a existência de correlações fortes no agrupamento. Pantazopoulos e colaboradores (2010) observaram, no córtex entorrinal e amígdala de pacientes com esquizofrenia, aumento de células gliais marcadas para CS sem aumento de astrócitos reativos, indicando que a ativação astroglial não é crucial para aumento da expressão de CS. Porém, em culturas de astrócitos a aplicação de metilprednisona (que inibe a ativação de astrócitos) antes de estimulação destes por AMPA inibe a produção de CS tipo fosfocan e neurocan (Liu *et al.*, 2008), indicando assim que a ativação de astrócitos é importante para alterações nos níveis de CSPG. No grupo TD, foram observadas correlações positivas entre a população microglial e a área de CS, e correlações positivas entre GFAP e CS em regiões onde os níveis de GFAP eram normais e negativa onde havia aumento de GFAP em relação aos valores do grupo Ctrl. Apesar das correlações negativas, não houve alteração significativa da área de CSPG em nenhuma região no grupo TD, o que pode indicar que a correlação negativa observada não apresente grande significado.

Por inspeção visual, não observamos células com morfologia microglial expressando CS, mas apenas células compatíveis com neurônios e astrócitos. Esta observação pode significar que as micróglias estão ligadas ao aumento da expressão do CS fibroso encontrado na MEC, uma vez que houve fortes correlações entre estas variáveis. As moléculas de neurocan, por exemplo, não ficam presas nas células, sendo depositadas no MEC, enquanto o fosfocan pode ficar preso na membrana celular via RPTP- $\beta$  (Fawcett e Asher, 1999). Outra possível explicação para este aumento nas correlações pode ser que os mesmos processos que estimulam o aumento da produção de CS no hipocampo também estimulam a ativação microglial. De fato, as próprias crises podem estimular tanto a ativação microglial (Boer *et al.*, 2006; Choi e Koh, 2008; Choi *et al.*, 2009) como a expressão de CS (Schwarzacher *et al.*, 2006). É possível, ainda, que a associação é mais por ação indireta das micróglias sobre a produção de CSPG por outros tipos celulares, como os astrócitos.

Quanto a correlações entre a população neuronal e a expressão de CS, observamos correlações positivas entre estes parâmetros nos grupos Ctrl e TD, enquanto do grupo ELTM não houve correlação. Observando os subgrupos de ELTM, vimos que havia correlações negativas entre CS e a população neuronal nas regiões onde havia aumento significativo de CS, observado pela comparação entre os grupos, indício de que, quando há aumento de CS, este é proporcional ao grau da perda neuronal. Em concordância com estas correlações, Liu e colaboradores (2008) comentaram que o aumento da expressão de CSPG é associado à perda neuronal.

Grande parte dos estudos de alteração dos CSPG no SNC foca a ligação entre estas moléculas e a plasticidade tecidual (Silver e Miller, 2004; Smith e Strunz, 2005; Huang *et al.*, 2006; Yiu e He, 2006; Lin *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). Estudos de danos na medula (Silver e Miller, 2004; Yiu e He, 2006; Liu *et al.*, 2008) ou no encéfalo (Lin *et al.*, 2008; Smith e Strunz, 2005; Huang *et al.*, 2006) mostram que as moléculas de CSPG produzidas tem efeitos inibitórios sobre o crescimento axonal e que a digestão do CS permite a extensão axonal. Crespo e colaboradores (2007) discutem que a condroitinase, enzima responsável pela digestão de CS, estimula o crescimento de neuritos e permite a mobilidade das espinhas dendríticas. Segundo Shimazaki e colaboradores (2005) o CS é importante para a migração e

maturação das células de Purkinje e para a diferenciação das glias de Bergmann. Em outra linha de estudo, Chekenya e colaboradores (2002) mostraram que o CSPG NG2 estimula a neovascularização em tumores.

Estudos investigando os efeitos da excitabilidade sobre a expressão de CSPG mostram que astrócitos estimulados por neurotransmissores aumentam a expressão de CS (Liu *et al.*, 2008) e que estimulação pode afetar a composição de CS da matriz (Okamoto *et al.*, 2003; Schwarzacher *et al.*, 2006). Schwarzacher e colaboradores (2006) mostraram, com estimulação da via perfurante, expressão temporária de neurocan em astrócitos, mesmo sem morte neuronal, nos alvos da via perfurante. Okamoto e colaboradores (2003) observaram, em ratos submetidos a crises por cainato, a redução de fosfocan ao redor de neurônios, coincidindo com a gravidade da perda neuronal, e a expressão de neurocan neonatal (de cadeia longo) e neurocan C ao redor de astrócitos, coincidindo com astrogliose. Estas alterações foram observadas nas regiões de contatos sinápticos (estratos de fibras e hilo) e tornam a matriz semelhante à existente durante o desenvolvimento hipocampal, no período de organização sináptica. Apesar de considerado inibitório, o neurocan estimula axônios que expressam L1, dentre os quais estão alguns neurônios hipocâmpais. Ainda, as crises recorrentes ocorrem assim que a matriz volta a expressar os CS presentes no hipocampo adulto (Okamoto *et al.*, 2003). Estes dados indicam que os CSPG podem ter influência crucial sobre a reorganização sináptica que ocorre com a morte neuronal e que, acredita-se (McNamara, 1994), pode ser responsável pelo surgimento de crises recorrentes.

A relação entre CSPG e o volume tecidual no tecido nervoso é ainda pouco estudada. Roitbak e Syková (1999) observaram aumento da fração de MEC e na tortuosidade do EEC após dano cortical. A linha temporal desta alteração nas características de difusão do tecido coincidiu com as alterações na população de astrócitos e na quantidade de CSPG, indicando ligação entre a alteração da MEC e na homeostase da água. Vorisek e colaboradores (2002) observaram que, neste mesmo modelo de injúria, ocorre aumento de GFAP no local da injúria e de CSPG em todo o hemisfério ipsilateral. O coeficiente de difusão aparente de água ( $ADC_w$ ) encontra-se reduzido em todo o hemisfério ipsilateral, coincidindo com o aumento de CSPG e com o coeficiente de difusão de tetrametilamônio ( $TMA^+$ ). Em um estudo com

espectroscopia por RNM, Takahashi e colaboradores (2001) mostraram, em pacientes com mucopolissacaridose, que a espectroscopia pode quantificar alterações nos níveis de CSPG mesmo em regiões sem lesão evidente. Nenhum estudo, entretanto, tentou avaliar a contribuição dos CSPG sobre a volumetria de regiões do SNC. No grupo ELTM, observamos correlação positiva fraca entre o nível de CS em CA1 e o volume hipocampal. Nos grupos com atrofia (AL e AG), também foram observadas correlações positivas. No grupo VN, houve correlações negativas entre características morfométricas e níveis de CS no prosúbulo e subículo, e no grupo AG houve correlação negativa entre CS na camada subgranular e o volume hipocampal. Devemos destacar, entretanto, que estas correlações negativas ocorreram ou em regiões pequenas demais e, portanto, pouco significantes sobre o volume hipocampal (i.e. camada subgranular e prosúbulo) ou em regiões praticamente inalteradas (i.e. subículo) quanto à densidade neuronal, que é o principal fator sobre o volume hipocampal. Deste modo, observamos que a área de CS correlaciona-se positivamente com a morfometria hipocampal.

A quantificação de ácido hialurônico (AH), realizada através do nível de cinza corrigido, demonstrou que não há significativa alteração na quantidade de ácido hialurônico nos grupos ELTM e TD quando comparados ao Ctrl. Apenas na camada subgranular do grupo AG foi observada redução significativa no nível de cinza de AH. Em linhas gerais, a marcação para AH concordou com a observada por Costa e colaboradores (2007) em camundongos CD1, sendo uma marcação difusa por toda a matriz extracelular e sem marcação citoplasmática ou nuclear em nenhum tipo celular. Esta marcação difusa ocorreu em todo o hipocampo e não foi mais tênue nas camadas moleculares da *fascia dentata* e CA, no hilo e no estrato lúcido de CA3, como observaram Costa e colaboradores (2007).

O AH é um polissacarídeo composto por repetições dos dissacarídeos GluA e GalNAc, os mesmos presentes na cadeia de polissacarídeos dos CSPG (Crespo *et al.*, 2007). Ao contrário dos CSPG, as cadeias de AH não ficam ligadas covalentemente a uma proteína-núcleo e não são sulfatadas (Crespo *et al.*, 2007). A biossíntese de AH ocorre no exterior da membrana celular, por vários tipos de sintases de ácido hialurônico (Frischknecht e Seidenbecher, 2008). Esta síntese extracelular explica a ausência de marcação intracelular para AH.

Estudos no SNC ligam ao ácido hialurônico à migração celular, tumorigênese, cicatrização, balanço de água no tecido e interação com sistema imune (Laurent e Fraser, 1992; Bourguignon *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009). Poucos trabalhos estudam ligações entre o AH e a epilepsia (Perosa *et al.*, 2002; Bausch, 2006; Borges *et al.*, 2004). Perosa e colaboradores (2002) mostraram que os níveis de AH são aumentados no hipocampo de pacientes com ELT. Encontramos aumento nos níveis de AH apenas na camada subgranular do grupo AG. O aumento nesta região pode ter relação com a ocorrência e gravidade do brotamento axonal, uma vez que, em culturas submetidas à cainato, a digestão do AH reduz o brotamento axonal (Bausch, 2006). Borges e colaboradores (2004) ligaram o brotamento axonal promovido em ratos por *status* por pilocarpina ao aumento de CD44, uma das principais proteínas ligantes de AH, na camada molecular interna. Entretanto, Bausch (2006), com bloqueio funcional de CD44, não encontrou alteração sobre o grau do brotamento axonal.

Com exceção da alteração na camada subgranular, houve homogeneidade na marcação de AH. Mesmo nos grupos ELTM, onde há grande perda neuronal e reação glial, as correlações entre o AH e as populações celulares manteve os mesmos padrões de correlação encontrados nos grupos TD e Ctrl, com correlações positivas entre a população neuronal e os níveis de HABP e negativas entre a população astrogliar e HABP. Quanto à população microglial, houve alteração no padrão observado no Ctrl, com apenas correlações positivas entre HLA-DR e HABP no grupo Ctrl e tanto positivas quanto negativas nos grupos ELTM e TD. É provável que tanto a manutenção quanto as alterações nestas correlações sofram mais os pesos das alterações encontradas nas populações celulares, uma vez que não houve diferença nos níveis de HABP. O fato de ser o arcabouço da matriz (Knudson e Knudson, 1993; Sim *et al.*, 2009) provavelmente explica a manutenção dos níveis de AH. Reforçando esta ideia, a degradação de AH foi ligada à redução da excitabilidade em CA1, porém rapidamente esta redução volta ao normal, o que indica que rapidamente a digestão é revertida (Frischknecht e Seidenbecher, 2008).

Alguns indícios apontam o AH como um fator importante sobre o volume tecidual. Em condições inflamatórias, este açúcar acumula-se e promove a formação de edema (Laurent e Fraser, 1992) e sua redução na MEC está associada ao estreitamento do espaço

extracelular (Knudson e Knudson, 1993). Sadeghi e colaboradores (2003) encontraram correlações positivas entre  $ADC_w$  de gliomas e sua quantidade de AH. Corroborando estes indícios, encontramos algumas correlações, positivas e negativas, entre várias regiões sem grande efeito sobre o volume hipocampal. Dentre as correlações encontradas destacam-se correlações positivas entre a área do corpo do hipocampo e os níveis de cinza de HABP no hilo dos grupos ELTM e AL e negativa entre o índice de atrofia e o nível de HABP em CA1 do grupo VN. De qualquer modo, devido ao menor número de casos avaliados para HABP, todos os resultados encontrados devem ser vistos com reservas.

### **5.6. Características teciduais e volume hipocampal**

Classicamente, os trabalhos com volumetria em RNM apontam a população neuronal como a principal responsável pelo volume hipocampal (Bronen *et al.*, 1997; Cascino *et al.*, 1991; Diehl *et al.*, 2002; Diehl *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 1994; Goncalves Pereira *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 1990; Kuzniecky *et al.*, 2001; Lehericy *et al.*, 1997; Lencz *et al.*, 1992; Van Paesschen *et al.*, 1997; Vossler *et al.*, 1998). Muitos trabalhos evidenciaram esta ligação de forma quantitativa (Van Paesschen *et al.*, 1997; Vossler *et al.*, 1998; Kuzniecky *et al.*, 2001; Briellmann *et al.*, 2002). A região CA1 é apontada como a mais relacionada ao volume do hipocampo (Van Paesschen *et al.*, 1997; Diehl *et al.*, 2002). A região CA1 é a maior região do hipocampo e a mais afetada na esclerose hipocampal humana (Van Paesschen, 2004; Boullieret *et al.*, 2000). Em trabalhos com ratos Sprague-Dawley submetidos a crises por cainato, Wolf e colaboradores (2002) observaram que, no hipocampo ventral a região mais afetada foi a CA1 e houve redução volumétrica significativa nesta porção do hipocampo.

Observando a correlação entre a população neuronal em CA1 e a volumetria hipocampal e sua concordância com a literatura, foram realizadas regressões múltiplas para avaliar quais outras das características avaliadas poderiam contribuir para a manutenção ou perda do volume hipocampal em pacientes com ELT. Observamos que as combinações entre a densidade neuronal ou medida da área imunopositiva para NeuN e a área imunopositiva para CS-56 explicam o volume hipocampal. Enquanto a densidade neuronal, a área de NeuN ou de CS-56 explicam, respectivamente, 16%, 20% e 9% do volume hipocampal, a

combinação entre a densidade neuronal e a área de CS-56 explicam 36% do volume e as áreas de NeuN e CS-56 explicam 37% do volume. Com a combinação, aumenta-se a relação entre a região CA1 e o volume hipocampal em 44% para a combinação entre densidade neuronal e área de CS-56 e em 28% para a combinação entre áreas de NeuN e CS-56. Estes achados fortalecem a importância da região CA1 sobre o volume hipocampal, uma vez que duas características de uma única região são responsáveis por quase 40% do volume de toda a formação hipocampal, e indicam que outras características teciduais além da população neuronal afetam o volume hipocampal.

## **6. CONCLUSÕES**

1. Independente do volume hipocampal medido na RNM, a perda neuronal e a gliose (astro/microgliose) são homogêneas no grupo ELTM.

2. Todas as alterações observadas foram mais graves no grupo ELTM do que no grupo TD, provavelmente por causa da esclerose hipocampal, que não é observada no grupo TD.

3. Mesmo no subículo, uma região preservada de morte neuronal no grupo ELTM, há alterações nas características destes neurônios, bem como alterações nas populações gliais, indicando que todas as regiões da formação hipocampal são alteradas na ELTM.

4. A expressão de MT-I/II apresentou dois perfis interessantes: no grupo TD, onde quase não há perda neuronal e alteração glial, esta proteína foi ligada à preservação da densidade neuronal; no grupo ELTM, onde a perda é grave independente do volume hipocampal, houve aumento significativo dos níveis de MT-I/II, ligando-a assim a processos crônicos teciduais da ELT.

5. A expressão de AQP4 perivascular foi reduzida no grupo ELTM e houve aumento qualitativo da AQP4 endotelial, indicando que esta proteína está alterada na ELT e pode afetar a homeostase da água. Entretanto, não houve correlação significativa entre AQP4 e a volumetria do grupo ELTM, o que indica que seu efeito sobre a volumetria poderia ser apenas observado em situações agudas de edema.

6. Das moléculas de matriz avaliadas apenas o condroitin sulfato apresentou aumento de marcação no grupo ELTM, sendo que o aumento ocorreu em mais áreas no grupo com volume normal do que nos grupos com atrofia na RNM, indicando que esta proteína é associada à manutenção do volume hipocampal observado na RNM, o que foi confirmado pela correlação encontrada entre o volume e a área de CS-56 em CA1 neste agrupamento.

7. De todas as variáveis teciduais estudadas, a população neuronal em CA1 foi a que melhor correlacionou-se com o volume hipocampal no grupo ELTM, seguida da área imunopositiva para condroitin sulfato, indicando que não tanto a população celular como a matriz extracelular são importantes para a manutenção ou perda de volume hipocampal medido na RNM.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, M.. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec*, v.94, n., p.239-147, 1946
- AGRE, P., KING, L. S., YASUI, M., GUGGINO, W. B., OTTERSEN, O. P., FUJIYOSHI, Y., ENGEL, A., NIELSEN, S.. Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*, v.542, n.Pt 1, p.3-16, 2002
- AMARAL,D., LAVENEX,P., 2006. Hippocampal Neuroanatomy. In: *The Hippocampus Book*, 1 Ed. Oxford University Press, 2006. p.37-114.
- AMIRY-MOGHADDAM, M., WILLIAMSON, A., PALOMBA, M., EID, T., DE LANEROLLE, N. C., NAGELHUS, E. A., ADAMS, M. E., FROEHNER, S. C., AGRE, P., OTTERSEN, O. P.. Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100, n.23, p.13615-13620, 2003
- ANDREWS, G. K.. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol*, v.59, n.1, p.95-104, 2000
- ANIKSZTEJN, L., CHARTON, G., BEN-ARI, Y.. Selective release of endogenous zinc from the hippocampal mossy fibers in situ. *Brain Res*, v.404, n.1-2, p.58-64, 1987
- ARAÚJO, D. Contribuição das medidas volumétricas das estruturas temporais mesiais e neocorticais ao tratamento cirúrgico da epilepsia do lobo temporal. 1-114. 2003. Universidade de São Paulo.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
- ASCHNER, M., CHERIAN, M. G., KLAASSEN, C. D., PALMITER, R. D., ERICKSON, J. C., BUSH, A. I.. Metallothioneins in brain--the role in physiology and pathology. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.142, n.2, p.229-242, 1997
- ASSAF, S. Y., CHUNG, S. H.. Release of endogenous Zn<sup>2+</sup> from brain tissue during activity. *Nature*, v.308, n.5961, p.734-736, 1984
- BABB, T. L., BROWN, W. J., PRETORIUS, J., DAVENPORT, C., LIEB, J. P., CRANDALL, P. H.. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, v.25, n.6, p.729-740, 1984

- BABB, T. L., KUPFER, W. R., PRETORIUS, J. K., CRANDALL, P. H., LEVESQUE, M. F.. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience*, v.42, n.2, p.351-363, 1991
- BABB, T. L., MATHERN, G. W., LEITE, J. P., PRETORIUS, J. K., YEOMAN, K. M., KUHLMAN, P. A.. Glutamate AMPA receptors in the fascia dentata of human and kainate rat hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res*, v.26, n.1, p.193-205, 1996
- BANATI, R. B., GOERRES, G. W., MYERS, R., GUNN, R. N., TURKHEIMER, F. E., KREUTZBERG, G. W., BROOKS, D. J., JONES, T., DUNCAN, J. S.. [11C](R)-PK11195 positron emission tomography imaging of activated microglia in vivo in Rasmussen's encephalitis. *Neurology*, v.53, n.9, p.2199-2203, 1999
- BANCILA, V., NIKONENKO, I., DUNANT, Y., BLOC, A.. Zinc inhibits glutamate release via activation of pre-synaptic K channels and reduces ischaemic damage in rat hippocampus. *J Neurochem*, v.90, n.5, p.1243-1250, 2004
- BAUSCH, S. B.. Potential roles for hyaluronan and CD44 in kainic acid-induced mossy fiber sprouting in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience*, v.143, n.1, p.339-350, 2006
- BEACH, T. G., WOODHURST, W. B., MACDONALD, D. B., JONES, M. W.. Reactive microglia in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett*, v.191, n.1-2, p.27-30, 1995
- BECK, H., BLUMCKE, I., KRAL, T., CLUSMANN, H., SCHRAMM, J., WIESTLER, O. D., HEINEMANN, U., ELGER, C. E.. Properties of a delayed rectifier potassium current in dentate granule cells isolated from the hippocampus of patients with chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, v.37, n.9, p.892-901, 1996
- BENKOVIC, S. A., O'CALLAGHAN, J. P., MILLER, D. B.. Regional neuropathology following kainic acid intoxication in adult and aged C57BL/6J mice. *Brain Res*, v.1070, n.1, p.215-231, 2006
- BERKOVIC, S. F., ANDERMANN, F., OLIVIER, A., ETHIER, R., MELANSON, D., ROBITAILLE, Y., KUZNIECKY, R., PETERS, T., FEINDEL, W.. Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*, v.29, n.2, p.175-182, 1991
- BINDER, D. K., PAPADOPOULOS, M. C., HAGGIE, P. M., VERKMAN, A. S.. In vivo measurement of brain extracellular space diffusion by cortical surface photobleaching. *J Neurosci*, v.24, n.37, p.8049-8056, 2004
- BINDER, D. K., STEINHAUSER, C.. Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia*, v.54, n.5, p.358-368, 2006
- BINDER, D. K., YAO, X., VERKMAN, A. S., MANLEY, G. T.. Increased seizure duration in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Acta Neurochir Suppl*, v.96, n., p.389-392, 2006

- BLOCK, M. L., ZECCA, L., HONG, J. S.. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, v.8, n.1, p.57-69, 2007
- BOER, K., SPLIET, W. G., VAN RIJEN, P. C., REDEKER, S., TROOST, D., ARONICA, E.. Evidence of activated microglia in focal cortical dysplasia. *J Neuroimmunol*, v.173, n.1-2, p.188-195, 2006
- BONDE, S., EKDAHL, C. T., LINDVALL, O.. Long-term neuronal replacement in adult rat hippocampus after status epilepticus despite chronic inflammation. *Eur J Neurosci*, v.23, n.4, p.965-974, 2006
- BONILHA, L., KOBAYASHI, E., CENDES, F., MIN, L. L.. Protocol for volumetric segmentation of medial temporal structures using high-resolution 3-D magnetic resonance imaging. *Hum Brain Mapp*, v.22, n.2, p.145-154, 2004
- BORGES, K., GEARING, M., MCDERMOTT, D. L., SMITH, A. B., ALMONTE, A. G., WAINER, B. H., DINGLEDINE, R.. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp Neurol*, v.182, n.1, p.21-34, 2003
- BORGES, K., MCDERMOTT, D. L., DINGLEDINE, R.. Reciprocal changes of CD44 and GAP-43 expression in the dentate gyrus inner molecular layer after status epilepticus in mice. *Exp Neurol*, v.188, n.1, p.1-10, 2004
- BOUILLERET, V., NEHLIG, A., MARESCAUX, C., NAMER, I. J.. Magnetic resonance imaging follow-up of progressive hippocampal changes in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, v.41, n.6, p.642-650, 2000
- BOURGUIGNON, L. Y., GILAD, E., PEYROLLIER, K., BRIGHTMAN, A., SWANSON, R. A.. Hyaluronan-CD44 interaction stimulates Rac1 signaling and PKN gamma kinase activation leading to cytoskeleton function and cell migration in astrocytes. *J Neurochem*, v.101, n.4, p.1002-1017, 2007
- BRIELLMANN, R. S., KALNINS, R. M., BERKOVIC, S. F., JACKSON, G. D.. Hippocampal pathology in refractory temporal lobe epilepsy: T2-weighted signal change reflects dentate gliosis. *Neurology*, v.58, n.2, p.265-271, 2002
- BRONEN, R. A., FULBRIGHT, R. K., KING, D., KIM, J. H., SPENCER, S. S., SPENCER, D. D., LANGE, R. C.. Qualitative MR imaging of refractory temporal lobe epilepsy requiring surgery: correlation with pathology and seizure outcome after surgery. *AJR Am J Roentgenol*, v.169, n.3, p.875-882, 1997
- CARRASCO, J., ADLARD, P., COTMAN, C., QUINTANA, A., PENKOWA, M., XU, F., VAN NOSTRAND, W. E., HIDALGO, J.. Metallothionein-I and -III expression in animal models of Alzheimer disease. *Neuroscience*, 2006
- CARRASCO, J., PENKOWA, M., HADBERG, H., MOLINERO, A., HIDALGO, J.. Enhanced seizures and hippocampal neurodegeneration following kainic acid-induced seizures in metallothionein-I + II-deficient mice. *Eur J Neurosci*, v.12, n.7, p.2311-2322, 2000

- CASCINO, G. D., JACK, C. R., JR., PARISI, J. E., SHARBROUGH, F. W., HIRSCHORN, K. A., MEYER, F. B., MARSH, W. R., O'BRIEN, P. C.. Magnetic resonance imaging-based volume studies in temporal lobe epilepsy: pathological correlations. *Ann Neurol*, v.30, n.1, p.31-36, 1991
- CENDES, F., ANDERMANN, F., DUBEAU, F., GLOOR, P., EVANS, A., JONES-GOTMAN, M., OLIVIER, A., ANDERMANN, E., ROBITAILLE, Y., LOPES-CENDES, I., .. Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology*, v.43, n.6, p.1083-1087, 1993
- CHAKIR, A., FABENE, P. F., OUAZZANI, R., BENTIVOGLIO, M.. Drug resistance and hippocampal damage after delayed treatment of pilocarpine-induced epilepsy in the rat. *Brain Res Bull*, v.71, n.1-3, p.127-138, 2006
- CHARTON, G., ROVIRA, C., BEN-ARI, Y., LEVIEL, V.. Spontaneous and evoked release of endogenous Zn<sup>2+</sup> in the hippocampal mossy fiber zone of the rat in situ. *Exp Brain Res*, v.58, n.1, p.202-205, 1985
- CHEKENYA, M., HJELSTUEN, M., ENGER, P. O., THORSEN, F., JACOB, A. L., PROBST, B., HARALDSETH, O., PILKINGTON, G., BUTT, A., LEVINE, J. M., BJERKVIG, R.. NG2 proteoglycan promotes angiogenesis-dependent tumor growth in CNS by sequestering angiostatin. *FASEB J*, v.16, n.6, p.586-588, 2002
- CHERIAN, M. G., HOWELL, S. B., IMURA, N., KLAASSEN, C. D., KOROPATNICK, J., LAZO, J. S., WAALKES, M. P.. Role of metallothionein in carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.126, n.1, p.1-5, 1994
- CHERIAN, M. G., HUANG, P. C., KLAASSEN, C. D., LIU, Y. P., LONGFELLOW, D. G., WAALKES, M. P.. National Cancer Institute workshop on the possible roles of metallothionein in carcinogenesis. *Cancer Res*, v.53, n.4, p.922-925, 1993
- CHOI, J., KOH, S.. Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Med J*, v.49, n.1, p.1-18, 2008
- CHOI, J., NORDLI, D. R., JR., ALDEN, T. D., DIPATRI, A., JR., LAUX, L., KELLEY, K., ROSENOW, J., SCHUELE, S. U., RAJARAM, V., KOH, S.. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. *J Neuroinflammation*, v.6, n., p.38, 2009
- CHUBATSU, L. S., MENEGHINI, R.. Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem J*, v.291 ( Pt 1), n., p.193-198, 1993
- CHUNG, R. S., PENKOWA, M., DITTMANN, J., KING, C. E., BARTLETT, C., ASMUSSEN, J. W., HIDALGO, J., CARRASCO, J., LEUNG, Y. K., WALKER, A. K., FUNG, S. J., DUNLOP, S. A., FITZGERALD, M., BEAZLEY, L. D., CHUAH, M. I., VICKERS, J. C., WEST, A. K.. Redefining the role of metallothionein within the injured brain: extracellular metallothioneins play an important role in the astrocyte-neuron response to injury. *J Biol Chem*, v.283, n.22, p.15349-15358, 2008

- CHUNG, R. S., WEST, A. K.. A role for extracellular metallothioneins in CNS injury and repair. *Neuroscience*, v.123, n.3, p.595-599, 2004
- CLOUES, R., JONES, S., BROWN, D. A.. Zn<sup>2+</sup> potentiates ATP-activated currents in rat sympathetic neurons. *Pflugers Arch*, v.424, n.2, p.152-158, 1993
- COLE, T. B., ROBBINS, C. A., WENZEL, H. J., SCHWARTZKROIN, P. A., PALMITER, R. D.. Seizures and neuronal damage in mice lacking vesicular zinc. *Epilepsy Res*, v.39, n.2, p.153-169, 2000
- COLE, T. B., WENZEL, H. J., KAFER, K. E., SCHWARTZKROIN, P. A., PALMITER, R. D.. Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.96, n.4, p.1716-1721, 1999
- COLLOMBET, J. M., MASQUELIEZ, C., FOUR, E., BURCKHART, M. F., BERNABE, D., BAUBICHON, D., LALLEMENT, G.. Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus. *Neurosci Lett*, v.398, n.3, p.337-342, 2006
- COLVIN, R. A., FONTAINE, C. P., LASKOWSKI, M., THOMAS, D.. Zn<sup>2+</sup> transporters and Zn<sup>2+</sup> homeostasis in neurons. *Eur J Pharmacol*, v.479, n.1-3, p.171-185, 2003
- COSTA, C., TORTOSA, R., DOMENECH, A., VIDAL, E., PUMAROLA, M., BASSOLS, A.. Mapping of aggrecan, hyaluronic acid, heparan sulphate proteoglycans and aquaporin 4 in the central nervous system of the mouse. *J Chem Neuroanat*, v.33, n.3, p.111-123, 2007
- CRANDALL, P.H., 1987. Cortical Resections. In: *Surgical Treatment of the Epilepsies*. New York: Raven Press, 1987. p.377-404.
- CRESPEL, A., COUBES, P., ROUSSET, M. C., BRANA, C., ROUGIER, A., RONDOUIN, G., BOCKAERT, J., BALDY-MOULINIER, M., LERNER-NATOLI, M.. Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Res*, v.952, n.2, p.159-169, 2002
- CRESPO, D., ASHER, R. A., LIN, R., RHODES, K. E., FAWCETT, J. W.. How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? *Exp Neurol*, v.206, n.2, p.159-171, 2007
- DA, T., VERKMAN, A. S.. Aquaporin-4 gene disruption in mice protects against impaired retinal function and cell death after ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v.45, n.12, p.4477-4483, 2004
- DAM, A. M.. Epilepsy and neuron loss in the hippocampus. *Epilepsia*, v.21, n.6, p.617-629, 1980
- DAVSON, H., SPAZIANI, E.. The blood-brain barrier and the extracellular space of brain. *J Physiol*, v.149, n., p.135-143, 1959

- DAWODU, S., THOM, M.. Quantitative neuropathology of the entorhinal cortex region in patients with hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, v.46, n.1, p.23-30, 2005
- DIEHL, B., NAJM, I., LAPRESTO, E., PRAYSON, R., RUGGIERI, P., MOHAMED, A., YING, Z., LIEBER, M., BABB, T., BINGAMAN, W., LUDERS, H. O.. Temporal lobe volumes in patients with hippocampal sclerosis with or without cortical dysplasia. *Neurology*, v.62, n.10, p.1729-1735, 2004
- DIEHL, B., NAJM, I., MOHAMED, A., BABB, T., YING, Z., BINGAMAN, W.. Interictal EEG, hippocampal atrophy, and cell densities in hippocampal sclerosis and hippocampal sclerosis associated with microscopic cortical dysplasia. *J Clin Neurophysiol*, v.19, n.2, p.157-162, 2002
- DRAGE, M. G., HOLMES, G. L., SEYFRIED, T. N.. Hippocampal neurons and glia in epileptic EL mice. *J Neurocytol*, v.31, n.8-9, p.681-692, 2002
- DUNN, M. A., BLALOCK, T. L., COUSINS, R. J.. Metallothionein. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.185, n.2, p.107-119, 1987
- EBADI, M., BROWN-BORG, H., EL, R. H., SINGH, B. B., GARRETT, S., SHAVALI, S., SHARMA, S. K.. Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res*, v.134, n.1, p.67-75, 2005
- EBADI, M., IVERSEN, P. L., HAO, R., CERUTIS, D. R., ROJAS, P., HAPPE, H. K., MURRIN, L. C., PFEIFFER, R. F. Expression and Regulation of Brain Metallothionein. *Neurochem.Int.* 27[1], 1-22. 1995.  
Ref Type: Generic
- EID, T., LEE, T. S., THOMAS, M. J., MIRY-MOGHADDAM, M., BJORNSEN, L. P., SPENCER, D. D., AGRE, P., OTTERSEN, O. P., DE LANEROLLE, N. C.. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K<sup>+</sup> homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.102, n.4, p.1193-1198, 2005
- ENGEL, J., JR., 1993. Protocols for the University of California, Los Angeles. In: *Surgical Treatment of the Epilepsies*. New York: Raven Press, 1993. p.743-745.
- ENGEL, J., JR., CASCINO, G.P., SHIELDS, W.D., 1997. Surgically Remediable Syndromes. In: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p.1687-1696.
- ENGEL, J., JR., LEVESQUE, M., CRANDALL, P.H., SHEWMAN, A., RAUSH, R., SUTULA, T., 1991. The Epilepsies. In: *Principals of Neurosurgery*. New York: Raven Press, 1991. p.319-358.
- ERIKSSON, S. H., FREE, S. L., THOM, M., SYMMS, M. R., MARTINIAN, L., DUNCAN, J. S., SISODIYA, S. M.. Quantitative grey matter histological measures do not correlate with grey matter probability values from in vivo MRI in the temporal lobe. *J Neurosci Methods*, v.181, n.1, p.111-118, 2009

- FABENE, P. F., MARZOLA, P., SBARBATI, A., BENTIVOGLIO, M.. Magnetic resonance imaging of changes elicited by status epilepticus in the rat brain: diffusion-weighted and T2-weighted images, regional blood volume maps, and direct correlation with tissue and cell damage. *Neuroimage*, v.18, n.2, p.375-389, 2003
- FALCONER, M. A., MEYER, A., HILL, D., MITCHELL, W., POND, D. A.. Treatment of temporal-lobe epilepsy by temporal lobectomy; a survey of findings and results. *Lancet*, v.268, n.6869, p.827-835, 1955
- FAWCETT, J. W., ASHER, R. A.. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*, v.49, n.6, p.377-391, 1999
- FEDELE, D. E., GOUDER, N., GUTTINGER, M., GABERNET, L., SCHEURER, L., RULICKE, T., CRESTANI, F., BOISON, D.. Astrogliosis in epilepsy leads to overexpression of adenosine kinase, resulting in seizure aggravation. *Brain*, v.128, n.Pt 10, p.2383-2395, 2005
- FORMIGARI, A., IRATO, P., SANTON, A.. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v.146, n.4, p.443-459, 2007
- FREDERICKSON, C. J., HERNANDEZ, M. D., MCGINTY, J. F.. Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Res*, v.480, n.1-2, p.317-321, 1989
- FREDERICKSON, C. J., KOH, J. Y., BUSH, A. I.. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, v.6, n.6, p.449-462, 2005b
- FREDERICKSON, C. J., KOH, J. Y., BUSH, A. I.. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, v.6, n.6, p.449-462, 2005a
- FREDERICKSON, C. J., MARET, W., CUAJUNGCO, M. P.. Zinc and excitotoxic brain injury: a new model. *Neuroscientist*, v.10, n.1, p.18-25, 2004
- FREDERICKSON, C. J., SUH, S. W., SILVA, D., FREDERICKSON, C. J., THOMPSON, R. B.. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr*, v.130, n.5S Suppl, p.1471S-1483S, 2000
- FRENCH, J. A., WILLIAMSON, P. D., THADANI, V. M., DARCEY, T. M., MATTSON, R. H., SPENCER, S. S., SPENCER, D. D.. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol*, v.34, n.6, p.774-780, 1993
- FRISCHKNECHT, R., SEIDENBECHER, C. I.. The crosstalk of hyaluronan-based extracellular matrix and synapses. *Neuron Glia Biol*, v.4, n.3, p.249-257, 2008
- FUERST, D., SHAH, J., KUPSKY, W. J., JOHNSON, R., SHAH, A., HAYMAN-ABELLO, B., ERGH, T., POORE, Q., CANADY, A., WATSON, C.. Volumetric MRI, pathological, and neuropsychological progression in hippocampal sclerosis. *Neurology*, v.57, n.2, p.184-188, 2001

- FUKAHORI, M., ITOH, M.. Effects of dietary zinc status on seizure susceptibility and hippocampal zinc content in the El (epilepsy) mouse. *Brain Res*, v.529, n.1-2, p.16-22, 1990
- FURMAN, C. S., GORELICK-FELDMAN, D. A., DAVIDSON, K. G., YASUMURA, T., NEELY, J. D., AGRE, P., RASH, J. E.. Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100, n.23, p.13609-13614, 2003
- GALTREY, C. M., FAWCETT, J. W.. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev*, v.54, n.1, p.1-18, 2007
- GARCIA, P. A., LAXER, K. D., BARBARO, N. M., DILLON, W. P.. Prognostic value of qualitative magnetic resonance imaging hippocampal abnormalities in patients undergoing temporal lobectomy for medically refractory seizures. *Epilepsia*, v.35, n.3, p.520-524, 1994
- GASTAUT, H., GASTAUT, J. L., GONCALVES E SILVA GE, FERNANDEZ SANCHEZ, G. R.. Relative frequency of different types of epilepsy: a study employing the classification of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, v.16, n.3, p.457-461, 1975
- GOERING, P. L., KLAASSEN, C. D.. Altered subcellular distribution of cadmium following cadmium pretreatment: possible mechanism of tolerance to cadmium-induced lethality. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.70, n.2, p.195-203, 1983
- GOERING, P. L., KLAASSEN, C. D.. Zinc-induced tolerance to cadmium hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.74, n.3, p.299-307, 1984
- GONCALVES PEREIRA, P. M., OLIVEIRA, E., ROSADO, P.. Relative localizing value of amygdalo-hippocampal MR biometry in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, v.69, n.2, p.147-164, 2006
- GOULD, E., BEYLIN, A., TANAPAT, P., REEVES, A., SHORS, T. J.. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*, v.2, n.3, p.260-265, 1999
- GOULD, E., MCEWEN, B. S., TANAPAT, P., GALEA, L. A., FUCHS, E.. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*, v.17, n.7, p.2492-2498, 1997
- GUADAGNO, E., MOUKHLES, H.. Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, and the water-permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes. *Glia*, v.47, n.2, p.138-149, 2004
- GUÉRIN, C. F., REGLI, L., BADAUT, J.. Rôles des aquaporines dans le cerveau. *Med Sci (Paris)*, v.21, n.8-9, p.747-752, 2005
- HANLON, J., MONKS, E., HUGHES, C., WEAVERS, E., ROGERS, M.. Metallothionein in bovine spongiform encephalopathy. *J Comp Pathol*, v.127, n.4, p.280-289, 2002

- HAWKINS, B. T., DAVIS, T. P.. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, v.57, n.2, p.173-185, 2005
- HECK, N., GARWOOD, J., LOEFFLER, J. P., LARMET, Y., FAISSNER, A.. Differential upregulation of extracellular matrix molecules associated with the appearance of granule cell dispersion and mossy fiber sprouting during epileptogenesis in a murine model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, v.129, n.2, p.309-324, 2004
- HIDALGO, J.. Metallothioneins and Brain Injury: What Transgenic Mice Tell Us. *Environ Health Prev Med*, p.87-94, 2004
- HIDALGO, J., PENKOWA, M., ESPEJO, C., MARTINEZ-CACERES, E. M., CARRASCO, J., QUINTANA, A., MOLINERO, A., FLORIT, S., GIRALT, M., ORTEGA-AZNAR, A.. Expression of metallothionein-I, -II, and -III in Alzheimer disease and animal models of neuroinflammation. *Exp Biol Med (Maywood)*, v.231, n.9, p.1450-1458, 2006
- HILDEBRANDT, M., PIEPER, T., WINKLER, P., KOLODZIEJCZYK, D., HOLTHAUSEN, H., BLUMCKE, I.. Neuropathological spectrum of cortical dysplasia in children with severe focal epilepsies. *Acta Neuropathol (Berl)*, v.110, n.1, p.1-11, 2005
- HILL, D., FALCONER, M. A., PAMPIGLIONE, G., LIDDELL, D. W.. Discussion on the surgery of temporal lobe epilepsy. *Proc R Soc Med*, v.46, n.11, p.965-976, 1953
- HOLLISTER, R. D., XIA, M., MCNAMARA, M. J., HYMAN, B. T.. Neuronal expression of class II major histocompatibility complex (HLA-DR) in 2 cases of Pick disease. *Arch Neurol*, v.54, n.3, p.243-248, 1997
- HOWELL, G. A., WELCH, M. G., FREDERICKSON, C. J.. Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature*, v.308, n.5961, p.736-738, 1984
- HUANG, W. C., KUO, W. C., CHERNG, J. H., HSU, S. H., CHEN, P. R., HUANG, S. H., HUANG, M. C., LIU, J. C., CHENG, H.. Chondroitinase ABC promotes axonal re-growth and behavior recovery in spinal cord injury. *Biochem Biophys Res Commun*, v.349, n.3, p.963-968, 2006
- JACKSON, G. D., BERKOVIC, S. F., TRESS, B. M., KALNINS, R. M., FABINYI, G. C., BLADIN, P. F.. Hippocampal sclerosis can be reliably detected by magnetic resonance imaging  
257. *Neurology*, v.40, n.12, p.1869-1875, 1990
- JACKSON, G. D., KUZNIECKY, R. I., CASCINO, G. D.. Hippocampal sclerosis without detectable hippocampal atrophy. *Neurology*, v.44, n.1, p.42-46, 1994
- JANSSON, L., WENNSTROM, M., JOHANSON, A., TINGSTROM, A.. Glial cell activation in response to electroconvulsive seizures. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.33, n.7, p.1119-1128, 2009
- KALUEFF, A. V., LEHTIMAKI, K. A., YLINEN, A., HONKANIEMI, J., PELTOLA, J.. Intranasal administration of human IL-6 increases the severity of chemically induced

seizures in rats. *Neuroscience letters*. *Neurosci Lett* 365[2]. 2004. 1922.  
Ref Type: Map

- KANG, T. C., KIM, D. S., KWAK, S. E., KIM, J. E., WON, M. H., KIM, D. W., CHOI, S. Y., KWON, O. S.. Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy. *Glia*, v.54, n.4, p.258-271, 2006
- KAUPPINEN, T. M., HIGASHI, Y., SUH, S. W., ESCARTIN, C., NAGASAWA, K., SWANSON, R. A.. Zinc triggers microglial activation. *J Neurosci*, v.28, n.22, p.5827-5835, 2008
- KAWAKITA, K., KAWAI, N., KURODA, Y., YASASHITA, S., NAGAO, S.. Expression of matrix metalloproteinase-9 in thrombin-induced brain edema formation in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, v.15, n.3, p.88-95, 2006
- KHURGEL, M., IVY, G. O.. Astrocytes in kindling: relevance to epileptogenesis. *Epilepsy Res*, v.26, n.1, p.163-175, 1996
- KILLE, P., HEMMINGS, A., LUNNEY, E. A.. Memories of metallothionein. *Biochim Biophys Acta*, v.1205, n., p.151-161, 1994
- KIM, E. H., KIM, T. S., SUN, W., KIM, D. S., CHUNG, H. S., KIM, D. K., PARK, S. H.. Differential regulation of metallothionein-I and metallothionein-II mRNA expression in the rat brain following traumatic brain injury. *Mol Cells*, v.18, n.3, p.326-331, 2004
- KIM, E. Y., KOH, J. Y., KIM, Y. H., SOHN, S., JOE, E., GWAG, B. J.. Zn<sup>2+</sup> entry produces oxidative neuronal necrosis in cortical cell cultures. *Eur J Neurosci*, v.11, n.1, p.327-334, 1999
- KIM, J. E., RYU, H. J., YEO, S. I., SEO, C. H., LEE, B. C., CHOI, I. G., KIM, D. S., KANG, T. C.. Differential expressions of aquaporin subtypes in astroglia in the hippocampus of chronic epileptic rats. *Neuroscience*, v.163, n.3, p.781-789, 2009
- KIM, J. H., GUIMARAES, P. O., SHEN, M. Y., MASUKAWA, L. M., SPENCER, D. D.. Hippocampal neuronal density in temporal lobe epilepsy with and without gliomas. *Acta Neuropathol*, v.80, n.1, p.41-45, 1990
- KIRKMAN, N. J., LIBBEY, J. E., WILCOX, K. S., WHITE, H. S., FUJINAMI, R. S.. Innate but not adaptive immune responses contribute to behavioral seizures following viral infection. *Epilepsia*, 2009
- KNUDSON, C. B., KNUDSON, W.. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J*, v.7, n.13, p.1233-1241, 1993
- KOH, J. Y., SUH, S. W., GWAG, B. J., HE, Y. Y., HSU, C. Y., CHOI, D. W.. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science*, v.272, n.5264, p.1013-1016, 1996
- KRALIC, J. E., LEDERGERBER, D. A., FRITSCHY, J. M.. Disruption of the neurogenic potential of the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. *Eur J Neurosci*, v.22, n.8, p.1916-1927, 2005

- KUMAR, A., CHUGANI, H. T., LUAT, A., ASANO, E., SOOD, S.. Epilepsy surgery in a case of encephalitis: use of 11C-PK11195 positron emission tomography. *Pediatr Neurol*, v.38, n.6, p.439-442, 2008
- KURAZONO, S., OKAMOTO, M., SAKIYAMA, J., MORI, S., NAKATA, Y., FUKUOKA, J., AMANO, S., OOHIRA, A., MATSUI, H.. Expression of brain specific chondroitin sulfate proteoglycans, neurocan and phosphacan, in the developing and adult hippocampus of Ihara's epileptic rats. *Brain Res*, v.898, n.1, p.36-48, 2001
- KUZNIECKY, R., PALMER, C., HUGG, J., MARTIN, R., SAWRIE, S., MORAWETZ, R., FAUGHT, E., KNOWLTON, R.. Magnetic resonance spectroscopic imaging in temporal lobe epilepsy: neuronal dysfunction or cell loss? 127. *Arch Neurol*, v.58, n.12, p.2048-2053, 2001
- KUZNIECKY, R. I., BILIR, E., GILLIAM, F., FAUGHT, E., PALMER, C., MORAWETZ, R., JACKSON, G.. Multimodality MRI in mesial temporal sclerosis: relative sensitivity and specificity. *Neurology*, v.49, n.3, p.774-778, 1997
- LAMUSUO, S., JUTILA, L., YLINEN, A., KALVIAINEN, R., MERVAALA, E., HAAPARANTA, M., JAASKELAINEN, S., PARTANEN, K., VAPALAHTI, M., RINNE, J.. [18F]FDG-PET reveals temporal hypometabolism in patients with temporal lobe epilepsy even when quantitative MRI and histopathological analysis show only mild hippocampal damage. *Arch Neurol*, v.58, n.6, p.933-939, 2001
- LAUBE, B., KUHSE, J., RUNDSTROM, N., KIRSCH, J., SCHMIEDEN, V., BETZ, H.. Modulation by zinc ions of native rat and recombinant human inhibitory glycine receptors. *J Physiol*, v.483 ( Pt 3), n., p.613-619, 1995
- LAURENT, T. C., FRASER, J. R.. Hyaluronan. *FASEB J*, v.6, n.7, p.2397-2404, 1992
- LEE, J. Y., KIM, J. H., PALMITER, R. D., KOH, J. Y.. Zinc released from metallothionein-iii may contribute to hippocampal CA1 and thalamic neuronal death following acute brain injury. *Exp Neurol*, v.184, n.1, p.337-347, 2003
- LEE, T. S., EID, T., MANE, S., KIM, J. H., SPENCER, D. D., OTTERSEN, O. P., DE LANEROLLE, N. C.. Aquaporin-4 is increased in the sclerotic hippocampus in human temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol (Berl)*, v.108, n.6, p.493-502, 2004
- LEE, Y. B., NAGAI, A., KIM, S. U.. Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res*, v.69, n.1, p.94-103, 2002
- LEHERICY, S., SEMAH, F., HASBOUN, D., DORMONT, D., CLEMENCEAU, S., GRANAT, O., MARSAULT, C., BAULAC, M.. Temporal lobe epilepsy with varying severity: MRI study of 222 patients 204. *Neuroradiology*, v.39, n.11, p.788-796, 1997
- LEITE, J. P., BABB, T. L., PRETORIUS, J. K., KUHLMAN, P. A., YEOMAN, K. M., MATHERN, G. W.. Neuron loss, mossy fiber sprouting, and interictal spikes after intrahippocampal kainate in developing rats. *Epilepsy Res*, v.26, n.1, p.219-231, 1996

- LEITE, J. P., TERRA-BUSTAMANTE, V. C., FERNANDES, R. M., SANTOS, A. C., CHIMELLI, L., SAKAMOTO, A. C., ASSIRATI, J. A., TAKAYANAGUI, O. M.. Calcified neurocysticercotic lesions and postsurgery seizure control in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, v.55, n.10, p.1485-1491, 2000
- LENCZ, T., MCCARTHY, G., BRONEN, R. A., SCOTT, T. M., INSERNI, J. A., SASS, K. J., NOVELLY, R. A., KIM, J. H., SPENCER, D. D.. Quantitative magnetic resonance imaging in temporal lobe epilepsy: relationship to neuropathology and neuropsychological function. *Ann Neurol*, v.31, n.6, p.629-637, 1992
- LEON CHAVEZ, B. A., GUEVARA, J., GALINDO, S., LUNA, J., UGARTE, A., VILLEGAS, O., MENA, R., EGUIBAR, J. R., MARTINEZ-FONG, D.. Regional and temporal progression of reactive astrocytosis in the brain of the myelin mutant taiep rat. *Brain Res*, v.900, n.1, p.152-155, 2001
- LI, C., PEOPLES, R. W., LI, Z., WEIGHT, F. F.. Zn<sup>2+</sup> potentiates excitatory action of ATP on mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.90, n.17, p.8264-8267, 1993
- LIN, C. M., LIN, J. W., CHEN, Y. C., SHEN, H. H., WEI, L., YEH, Y. S., CHIANG, Y. H., SHIH, R., CHIU, P. L., HUNG, K. S., YANG, L. Y., CHIU, W. T.. Hyaluronic acid inhibits the glial scar formation after brain damage with tissue loss in rats. *Surg Neurol*, v.72 Suppl 2, n., p.S50-S54, 2009
- LIN, R., KWOK, J. C., CRESPO, D., FAWCETT, J. W.. Chondroitinase ABC has a long-lasting effect on chondroitin sulphate glycosaminoglycan content in the injured rat brain. *J Neurochem*, v.104, n.2, p.400-408, 2008
- LIU, W. L., LEE, Y. H., TSAI, S. Y., HSU, C. Y., SUN, Y. Y., YANG, L. Y., TSAI, S. H., YANG, W. C.. Methylprednisolone inhibits the expression of glial fibrillary acidic protein and chondroitin sulfate proteoglycans in reactivated astrocytes. *Glia*, v.56, n.13, p.1390-1400, 2008
- LUKASIUK, K., PITKANEN, A.. Large-scale analysis of gene expression in epilepsy research: is synthesis already possible? *Neurochem Res*, v.29, n.6, p.1169-1178, 2004
- MARET, W.. Zinc and Health: Current Status and Future Directions. *J Nutr*, p.1455S-1458S, 2000
- MARGERISON, J. H., CORSELLIS, J. A.. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*, v.89, n.3, p.499-530, 1966
- MARTINIAN, L., BOER, K., MIDDELDORP, J., HOL, E. M., SISODIYA, S. M., SQUIER, W., ARONICA, E., THOM, M.. Expression patterns of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-delta in epilepsy-associated lesional pathologies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v.35, n.4, p.394-405, 2009
- MARTINS, A. R., DIAS, M. M., VASCONCELOS, T. M., CALDO, H., COSTA, M. C., CHIMELLI, L., LARSON, R. E.. Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. *J Neurosci Methods*, v.92, n.1-2, p.25-29, 1999

- MATHERN, G. W., ADELSON, P. D., CAHAN, L. D., LEITE, J. P.. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revised. *Prog Brain Res*, v.135, n., p.237-251, 2002
- MATHERN, G. W., BABB, T. L., VICKREY, B. G., MELENDEZ, M., PRETORIUS, J. K.. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain*, v.118 ( Pt 1), n., p.105-118, 1995a
- MATHERN, G. W., CIFUENTES, F., LEITE, J. P., PRETORIUS, J. K., BABB, T. L.. Hippocampal EEG excitability and chronic spontaneous seizures are associated with aberrant synaptic reorganization in the rat intrahippocampal kainate model. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, v.87, n.5, p.326-339, 1993
- MATHERN, G. W., KUHLMAN, P. A., MENDOZA, D., PRETORIUS, J. K.. Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. *J Neuropathol Exp Neurol*, v.56, n.2, p.199-212, 1997
- MATHERN, G. W., LEITE, J. P., BABB, T. L., PRETORIUS, J. K., KUHLMAN, P. A., MENDOZA, D., FRIED, I., SAKAMOTO, A. C., ASSIRATI, J. A., ADELSON, P. D., PEACOCK, W. J.. Aberrant hippocampal mossy fiber sprouting correlates with greater NMDAR2 receptor staining. *Neuroreport*, v.7, n.5, p.1029-1035, 1996
- MATHERN, G. W., LEITE, J. P., PRETORIUS, J. K., QUINN, B., PEACOCK, W. J., BABB, T. L.. Children with severe epilepsy: evidence of hippocampal neuron losses and aberrant mossy fiber sprouting during postnatal granule cell migration and differentiation. *Brain Res Dev Brain Res*, v.78, n.1, p.70-80, 1994
- MATHERN, G. W., PRETORIUS, J. K., BABB, T. L.. Influence of the type of initial precipitating injury and at what age it occurs on course and outcome in patients with temporal lobe seizures. *J Neurosurg*, v.82, n.2, p.220-227, 1995b
- MCNAMARA, J. O.. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci*, v.14, n.6, p.3413-3425, 1994
- MEIGHAN, S. E., MEIGHAN, P. C., CHOUDHURY, P., DAVIS, C. J., OLSON, M. L., ZORNES, P. A., WRIGHT, J. W., HARDING, J. W.. Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity. *J Neurochem*, v.96, n.5, p.1227-1241, 2006
- MELLO, L. E., CAVALHEIRO, E. A., TAN, A. M., KUPFER, W. R., PRETORIUS, J. K., BABB, T. L., FINCH, D. M.. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*, v.34, n.6, p.985-995, 1993
- MENET, V., PRIETO, M., PRIVAT, A., RIBOTTA, M.. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100, n.15, p.8999-9004, 2003
- MITCHELL, C. L., BARNES, M. I.. Proconvulsant action of diethyldithiocarbamate in stimulation of the perforant path. *Neurotoxicol Teratol*, v.15, n.3, p.165-171, 1993

- MIURA, N., NAGANUMA, A.. Metallothionein mediates gene expression of 3.1 mRNA (PTZ17) related to epileptic seizure. *FEBS Lett*, v.479, n.3, p.146-148, 2000
- MOCHEGANI, E., BERTONI-FREDDARI, C., MARCELLINI, F., MALAVOLTA, M.. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol*, v.75, n.6, p.367-390, 2005
- MONTPIED, P., DE, B. F., BALDY-MOULINIER, M., RONDOUIN, G.. Alterations of metallothionein II and apolipoprotein J mRNA levels in kainate-treated rats. *Neuroreport*, v.9, n.1, p.79-83, 1998
- NADLER, J. V.. The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochem Res*, v.28, n.11, p.1649-1658, 2003
- NAGELHUS, E. A., MATHIISEN, T. M., OTTERSEN, O. P.. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience*, v.129, n.4, p.905-913, 2004
- NAIRISMAGI, J., GROHN, O. H., KETTUNEN, M. I., NISSINEN, J., KAUPPINEN, R. A., PITKANEN, A.. Progression of brain damage after status epilepticus and its association with epileptogenesis: a quantitative MRI study in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, v.45, n.9, p.1024-1034, 2004
- NAKAZAWA, K., INOUE, K., WATANO, T., KOIZUMI, S., INOUE, K.. Zinc potentiation of neurotransmission and inhibition of background cationic conductance in rat cultured hippocampal neurones. *J Physiol*, v.484 ( Pt 2), n., p.447-462, 1995
- NESIC, O., LEE, J., YE, Z., UNABIA, G. C., RAFATI, D., HULSEBOSCH, C. E., PEREZ-POLO, J. R.. Acute and chronic changes in aquaporin 4 expression after spinal cord injury. *Neuroscience*, v.143, n.3, p.779-792, 2006
- NOELL, S., FALLIER-BECKER, P., BEYER, C., KROGER, S., MACK, A. F., WOLBURG, H.. Effects of agrin on the expression and distribution of the water channel protein aquaporin-4 and volume regulation in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci*, v.26, n.8, p.2109-2118, 2007
- OKAMOTO, M., SAKIYAMA, J., MORI, S., KURAZONO, S., USUI, S., HASEGAWA, M., OOHIRA, A.. Kainic acid-induced convulsions cause prolonged changes in the chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan in the limbic structures. *Exp Neurol*, v.184, n.1, p.179-195, 2003
- OTANI, N., NAWASHIRO, H., FUKUI, S., OOIGAWA, H., OHSUMI, A., TOYOOKA, T., SHIMA, K., GOMI, H., BRENNER, M.. Enhanced hippocampal neurodegeneration after traumatic or kainate excitotoxicity in GFAP-null mice. *J Clin Neurosci*, v.13, n.9, p.934-938, 2006
- PALUMAA, P., TAMMISTE, I., KRUSEL, K., KANGUR, L., JORNVALL, H., SILLARD, R.. Metal binding of metallothionein-3 versus metallothionein-2: lower affinity and higher plasticity. *Biochim Biophys Acta*, v.1747, n.2, p.205-211, 2005

- PANTAZOPOULOS, H., WOO, T. U., LIM, M. P., LANGE, N., BERRETTA, S..  
Extracellular matrix-glia abnormalities in the amygdala and entorhinal cortex of subjects diagnosed with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, v.67, n.2, p.155-166, 2010
- PAPADOPOULOS, M. C., MANLEY, G. T., KRISHNA, S., VERKMAN, A. S.. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J*, v.18, n.11, p.1291-1293, 2004
- PAPADOPOULOS, M. C., VERKMAN, A. S.. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem*, v.280, n.14, p.13906-13912, 2005
- PAPADOPOULOS, M. C., VERKMAN, A. S.. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol*, v.22, n.6, p.778-784, 2007
- PATEL, H. C., ROSS, F. M., HEENAN, L. E., DAVIES, R. E., ROTHWELL, N. J., ALLAN, S. M. Neurodegenerative actions of interleukin-1 in the rat brain are mediated through increases in seizure activity. *Journal of neuroscience research. J Neurosci Res* 83[3]. 2006. 1915.  
Ref Type: Map
- PAZDERNIK, T. L., EMERSON, M. R., CROSS, R., NELSON, S. R., SAMSON, F. E..  
Soman-induced seizures: limbic activity, oxidative stress and neuroprotective proteins. *J Appl Toxicol*, v.21 Suppl 1, n., p.S87-S94, 2001
- PEI, Y. Q., KOYAMA, I. Features of seizures and behavioral changes induced by intrahippocampal injection of zinc sulfate in the rabbit: a new experimental model of epilepsy. *Epilepsia*, v.27, n.3, p.183-188, 1986
- PEIXOTO-SANTOS, J. E., GALVIS-ALONSO, O. Y., ARAÚJO, D., ASSIRATI, J. A., CARLOTTI, C. G., SCANDIUZZI, R. C., LEITE, J. P. Astrocitose e expressão de metalotioneínas I/II na formação hipocampal de pacientes com ELTM e diferentes graus de atrofia. XXXII Congresso Brasileiro de Epilepsia. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology* 14 n 2 suppl 1, 75-76. 2008a.  
Ref Type: Conference Proceeding
- PEIXOTO-SANTOS, J. E., GALVIS-ALONSO, O. Y., CARLOTTI, C. G., ASSIRATI, J. A., ARAÚJO, D., SCANDIUZZI, R. C., LEITE, J. P. Padrões de perda neuronal e reorganização axonal em pacientes com ELTM e diferentes graus de atrofia hipocampal pela RNM. XXXII Congresso Brasileiro de Epilepsia. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology* 14 n 2 suppl 1, 75. 2008b.  
Ref Type: Conference Proceeding
- PENKOWA, M., FLORIT, S., GIRALT, M., QUINTANA, A., MOLINERO, A., CARRASCO, J., HIDALGO, J.. Metallothionein reduces central nervous system inflammation, neurodegeneration, and cell death following kainic acid-induced epileptic seizures. *J Neurosci Res*, v.79, n.4, p.522-534, 2005
- PENKOWA, M., MOLINERO, A., CARRASCO, J., HIDALGO, J.. Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and

- neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. *Neuroscience*, v.102, n.4, p.805-818, 2001
- PEREZ-CLAUSELL, J.. Distribution of terminal fields stained for zinc in the neocortex of the rat. *J Chem Neuroanat*, v.11, n.2, p.99-111, 1996
- PEREZ-CLAUSELL, J., DANSCHER, G.. Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study. *Brain Res*, v.337, n.1, p.91-98, 1985
- PEROSA, S. R., PORCIONATTO, M. A., CUKIERT, A., MARTINS, J. R., PASSEROTI, C. C., AMADO, D., MATAS, S. L., NADER, H. B., CAVALHEIRO, E. A., LEITE, J. P., NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.. Glycosaminoglycan levels and proteoglycan expression are altered in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res Bull*, v.58, n.5, p.509-516, 2002
- PETERS, S., KOH, J., CHOI, D. W.. Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science*, v.236, n.4801, p.589-593, 1987
- PITKANEN, A., SUTULA, T. P.. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol*, v.1, n.3, p.173-181, 2002
- PRAYSON, R. A., YODER, B. J.. Clinicopathologic findings in mesial temporal sclerosis treated with gamma knife radiotherapy. *Ann Diagn Pathol*, v.11, n.1, p.22-26, 2007
- PROPER, E. A., JANSEN, G. H., VAN VEELLEN, C. W., VAN RIJEN, P. C., GISPEN, W. H., DE GRAAN, P. N.. A grading system for hippocampal sclerosis based on the degree of hippocampal mossy fiber sprouting. *Acta Neuropathol (Berl)*, v.101, n.4, p.405-409, 2001
- PRUESSNER, J. C., LI, L. M., SERLES, W., PRUESSNER, M., COLLINS, D. L., KABANI, N., LUPIEN, S., EVANS, A. C.. Volumetry of hippocampus and amygdala with high-resolution MRI and three-dimensional analysis software: minimizing the discrepancies between laboratories. *Cereb Cortex*, v.10, n.4, p.433-442, 2000
- RAPPOLD, P. M., LYND-BALTA, E., JOSEPH, S. A.. P2X7 receptor immunoreactive profile confined to resting and activated microglia in the epileptic brain. *Brain Res*, v.1089, n.1, p.171-178, 2006
- RASH, J. E., YASUMURA, T., HUDSON, C. S., AGRE, P., NIELSEN, S.. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.95, n., p.11981-11986, 1998
- RASSENDREN, F. A., LORY, P., PIN, J. P., NARGEOT, J.. Zinc has opposite effects on NMDA and non-NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron*, v.4, n.5, p.733-740, 1990
- RAVIZZA, T., LUCAS, S. M., BALOSSO, S., BERNARDINO, L., KU, G., NOE, F., MALVA, J., RANDLE, J. C., ALLAN, S., VEZZANI, A. Inactivation of caspase-1 in

- rodent brain: a novel anticonvulsive strategy. *Epilepsia*. *Epilepsia* 47[7]. 2006.  
Ref Type: Map
- REYNOLDS,E.H., BHARUCHA,N.E., SANDER,J.W., 2005. Epilepsy: The disorder. In: *Epilepsy Atlas*. 2005. p.15-27.
- ROCH, C., LEROY, C., NEHLIG, A., NAMER, I. J.. Magnetic resonance imaging in the study of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia*, v.43, n.4, p.325-335, 2002
- ROITBAK, T., SYKOVA, E.. Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis. *Glia*, v.28, n.1, p.40-48, 1999
- SADEGHI, N., CAMBY, I., GOLDMAN, S., GABIUS, H. J., BALERIAUX, D., SALMON, I., DECAESTECKER, C., KISS, R., METENS, T.. Effect of hydrophilic components of the extracellular matrix on quantifiable diffusion-weighted imaging of human gliomas: preliminary results of correlating apparent diffusion coefficient values and hyaluronan expression level. *AJR Am J Roentgenol*, v.181, n.1, p.235-241, 2003
- SALANOVA, V., MARKAND, O., WORTH, R., GARG, B., PATEL, H., ASCONAPE, J., PARK, H. M., HUTCHINS, G. D., SMITH, R., AZZARELLI, B.. Presurgical evaluation and surgical outcome of temporal lobe epilepsy. *Pediatr Neurol*, v.20, n.3, p.179-184, 1999
- SCHWARZACHER, S. W., VUKSIC, M., HAAS, C. A., BURBACH, G. J., SLOVITER, R. S., DELLER, T.. Neuronal hyperactivity induces astrocytic expression of neurocan in the adult rat hippocampus. *Glia*, v.53, n.7, p.704-714, 2006
- SHAPIRO, L. A., WANG, L., RIBAK, C. E.. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsia*, v.49 Suppl 2, n., p.33-41, 2008
- SHIMAZAKI, Y., NAGATA, I., ISHII, M., TANAKA, M., MARUNOUCHI, T., HATA, T., MAEDA, N.. Developmental change and function of chondroitin sulfate deposited around cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci Res*, v.82, n.2, p.172-183, 2005
- SILVER, J., MILLER, J. H.. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*, v.5, n.2, p.146-156, 2004
- SIM, H., HU, B., VIAPIANO, M. S.. Reduced expression of the hyaluronan and proteoglycan link proteins in malignant gliomas. *J Biol Chem*, v.284, n.39, p.26547-26556, 2009
- SLOVITER, R. S.. A selective loss of hippocampal mossy fiber Timm stain accompanies granule cell seizure activity induced by perforant path stimulation. *Brain Res*, v.330, n.1, p.150-153, 1985
- SMITH, G. M., STRUNZ, C.. Growth factor and cytokine regulation of chondroitin sulfate proteoglycans by astrocytes. *Glia*, v.52, n.3, p.209-218, 2005
- SOLENOV, E., WATANABE, H., MANLEY, G. T., VERKMAN, A. S.. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice,

- measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.286, n.2, p.C426-C432, 2004
- STICHEL, C. C., KAPPLER, J., JUNGHANS, U., KOOPS, A., KRESSE, H., MULLER, H. W.. Differential expression of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans decorin and biglycan after injury of the adult rat brain. *Brain Res*, v.704, n.2, p.263-274, 1995
- SUH, S. W., CHEN, J. W., MOTAMEDI, M., BELL, B., LISTIAK, K., PONS, N. F., DANSCHER, G., FREDERICKSON, C. J.. Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Res*, v.852, n.2, p.268-273, 2000
- SUTULA, T., CASCINO, G., CAVAZOS, J., PARADA, I., RAMIREZ, L.. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol*, v.26, n.3, p.321-330, 1989
- SWANN, K., BERGER, J., SPRAGUE, S. M., WU, Y., LAI, Q., JIMENEZ, D. F., BARONE, C. M., DING, Y.. Peripheral thermal injury causes blood-brain barrier dysfunction and matrix metalloproteinase (MMP) expression in rat. *Brain Res*, v.1129, n.1, p.26-33, 2007
- SWARTZ, B. E., HOUSER, C. R., TOMIYASU, U., WALSH, G. O., DESALLES, A., RICH, J. R., GADO-ESCUETA, A.. Hippocampal cell loss in posttraumatic human epilepsy. *Epilepsia*, v.47, n.8, p.1373-1382, 2006
- SYKOVA, E.. Diffusion properties of the brain in health and disease. *Neurochem Int*, v.45, n.4, p.453-466, 2004
- SYKOVA, E., VORISEK, I., MAZEL, T., ANTONOVA, T., SCHACHNER, M.. Reduced extracellular space in the brain of tenascin-R- and HNK-1-sulphotransferase deficient mice. *Eur J Neurosci*, v.22, n.8, p.1873-1880, 2005
- TAKAHASHI, Y., SUKEGAWA, K., AOKI, M., ITO, A., SUZUKI, K., SAKAGUCHI, H., WATANABE, M., ISOGAI, K., MIZUNO, S., HOSHI, H., KUWATA, K., TOMATSU, S., KATO, S., ITO, T., KONDO, N., ORII, T.. Evaluation of accumulated mucopolysaccharides in the brain of patients with mucopolysaccharidoses by (1)H-magnetic resonance spectroscopy before and after bone marrow transplantation. *Pediatr Res*, v.49, n.3, p.349-355, 2001
- TAKEDA, A.. Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain. *Biometals*, v.14, n.3-4, p.343-351, 2001
- TAKEDA, A., ITOH, H., TAMANO, H., OKU, N.. Responsiveness to kainate in young rats after 2-week zinc deprivation. *Biometals*, v.19, n.5, p.565-572, 2006
- TASCH, E., CENDES, F., LI, L. M., DUBEAU, F., ANDERMANN, F., ARNOLD, D. L.. Neuroimaging evidence of progressive neuronal loss and dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, v.45, n.5, p.568-576, 1999

- TAUCK, D. L., NADLER, J. V.. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci*, v.5, n.4, p.1016-1022, 1985
- TERRA, V. C., CHIMELLI, L. M. C., GARZON, E., MATHERN, G. W., ASSIRATI, J. A., SAKAMOTO, A. C., LEITE, J. P.. Cell densities and altered patterns of neo-Timm's staining in the hippocampus and entorhinal cortex of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, v.38, n.8, p.24, 1997
- TREIBER, C.. Metals on the brain. *Sci Aging Knowledge Environ*, v.2005, n.36, p.e27, 2005
- TRENDELENBURG, G., PRASS, K., PRILLER, J., KAPINYA, K., POLLEY, A., MUSELMANN, C., RUSCHER, K., KANNBLEY, U., SCHMITT, A. O., CASTELL, S., WIEGAND, F., MEISEL, A., ROSENTHAL, A., DIRNAGL, U.. Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, v.22, n.14, p.5879-5888, 2002
- UHLMANN, E. J., WONG, M., BALDWIN, R. L., BAJENARU, M. L., ONDA, H., KWIATKOWSKI, D. J., YAMADA, K., GUTMANN, D. H.. Astrocyte-specific TSC1 conditional knockout mice exhibit abnormal neuronal organization and seizures. *Ann Neurol*, v.52, n.3, p.285-296, 2002
- VAN LOOKEREN, C. M., THIBODEAUX, H., VAN, B. N., CAIRNS, B., GERLAI, R., PALMER, J. T., WILLIAMS, S. P., LOWE, D. G.. Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.96, n.22, p.12870-12875, 1999
- VAN PAESSCHEN, W.. Qualitative and quantitative imaging of the hippocampus in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am*, v.14, n.3, p.373-400, vii, 2004
- VAN PAESSCHEN, W., REVESZ, T., DUNCAN, J. S., KING, M. D., CONNELLY, A.. Quantitative neuropathology and quantitative magnetic resonance imaging of the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, v.42, n.5, p.756-766, 1997
- VAN VLIET, E. A., DA COSTA, A. S., REDEKER, S., VAN, S. R., ARONICA, E., GORTER, J. A.. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*, v.130, n.Pt 2, p.521-534, 2007
- VERKMAN, A. S.. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci*, v.118, n.Pt 15, p.3225-3232, 2005
- VERKMAN, A. S., BINDER, D. K., BLOCH, O., AUGUSTE, K., PAPADOPOULOS, M. C.. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim Biophys Acta*, v.1758, n.8, p.1085-1093, 2006
- VESSAL, M., DUGANI, C. B., SOLOMON, D. A., MCINTYRE, B. W., IVY, G. O.. Might astrocytes play a role in maintaining the seizure-prone state? *Brain Res*, v.1044, n.2, p.190-196, 2005

- VEZZANI, A., MONETA, D., CONTI, M., RICHICHI, C., RAVIZZA, T., DE LUIGI, A., DE SIMONI, M. G., SPERK, G., ANDELL-JONSSON, S., LUNDKVIST, J., IVERFELDT, K., BARTFAI, T. Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Proc Natl Acad Sci U S A* 97[21]. 2000. 1910.  
Ref Type: Map
- VITELLARO-ZUCCARELLO, L., MAZZETTI, S., BOSISIO, P., MONTI, C., DE, B. S.. Distribution of Aquaporin 4 in rodent spinal cord: relationship with astrocyte markers and chondroitin sulfate proteoglycans. *Glia*, v.51, n.2, p.148-159, 2005
- VORISEK, I., HAJEK, M., TINTERA, J., NICOLAY, K., SYKOVA, E.. Water ADC, extracellular space volume, and tortuosity in the rat cortex after traumatic injury. *Magn Reson Med*, v.48, n.6, p.994-1003, 2002
- VOSSLER, D. G., KRAEMER, D. L., KNOWLTON, R. C., KJOS, B. O., ROSTAD, S. W., WYLER, A. R., HALTINER, A. M., HASEGAWA, H., WILKUS, R. J.. Temporal ictal electroencephalographic frequency correlates with hippocampal atrophy and sclerosis. *Ann Neurol*, v.43, n.6, p.756-762, 1998
- WANG, F., FENG, X. C., LI, Y. M., YANG, H., MA, T. H.. Aquaporins as potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin*, v.27, n.4, p.395-401, 2006
- WEISS, J. H., SENSI, S. L., KOH, J. Y.. Zn(2+): a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol Sci*, v.21, n.10, p.395-401, 2000
- WENZEL, H. J., COLE, T. B., BORN, D. E., SCHWARTZKROIN, P. A., PALMITER, R. D.. Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.94, n.23, p.12676-12681, 1997
- WESTBROOK, G. L., MAYER, M. L.. Micromolar concentrations of Zn<sup>2+</sup> antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature*, v.328, n.6131, p.640-643, 1987
- WIESE, L., KURTZHALS, J. A., PENKOWA, M.. Neuronal apoptosis, metallothionein expression and proinflammatory responses during cerebral malaria in mice. *Exp Neurol*, v.200, n.1, p.216-226, 2006
- WIESHMANN, U. C., CLARK, C. A., SYMMS, M. R., BARKER, G. J., BIRNIE, K. D., SHORVON, S. D.. Water diffusion in the human hippocampus in epilepsy. *Magn Reson Imaging*, v.17, n.1, p.29-36, 1999
- WIRENFELDT, M., CLARE, R., TUNG, S., BOTTINI, A., MATHERN, G. W., VINTERS, H. V.. Increased activation of Iba1+ microglia in pediatric epilepsy patients with Rasmussen's encephalitis compared with cortical dysplasia and tuberous sclerosis complex. *Neurobiol Dis*, v.34, n.3, p.432-440, 2009

- WOLF, H. K., BUSLEI, R., SCHMIDT-KASTNER, R., SCHMIDT-KASTNER, P. K., PIETSCH, T., WIESTLER, O. D., BLUMCKE, I.. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*, v.44, n.10, p.1167-1171, 1996
- WOLF, O. T., DYAKIN, V., PATEL, A., VADASZ, C., DE LEON, M. J., MCEWEN, B. S., BULLOCH, K.. Volumetric structural magnetic resonance imaging (MRI) of the rat hippocampus following kainic acid (KA) treatment. *Brain Res*, v.934, n.2, p.87-96, 2002
- WONG, M.. Astrocyte networks and epilepsy: when stars collide. *Epilepsy Curr*, v.9, n.4, p.113-115, 2009
- WONG, M., ESS, K. C., UHLMANN, E. J., JANSEN, L. A., LI, W., CRINO, P. B., MENNERICK, S., YAMADA, K. A., GUTMANN, D. H.. Impaired glial glutamate transport in a mouse tuberous sclerosis epilepsy model. *Ann Neurol*, v.54, n.2, p.251-256, 2003
- WRIGHT, D. M.. Effect of zinc on neuronal activity in the rat forebrain. *Adv Exp Med Biol*, v.203, n., p.599-609, 1986
- YANG, F., LIU, Z. R., CHEN, J., ZHANG, S. J., QUAN, Q. Y., HUANG, Y. G., JIANG, W.. Roles of astrocytes and microglia in seizure-induced aberrant neurogenesis in the hippocampus of adult rats. *J Neurosci Res*, v.88, n.3, p.519-529, 2010
- YIN, J., SAKAMOTO, K., ZHANG, H., ITO, Z., IMAGAMA, S., KISHIDA, S., NATORI, T., SAWADA, M., MATSUYAMA, Y., KADOMATSU, K.. Transforming growth factor-beta1 upregulates keratan sulfate and chondroitin sulfate biosynthesis in microglia after brain injury. *Brain Res*, v.1263, n., p.10-22, 2009
- YIU, G., HE, Z.. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci*, v.7, n.8, p.617-627, 2006

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)