

Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology

Revista de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica

www.epilepsia.org.br/jecn

Volume 18 – Number 2
June, 2012

- Long-Term Prognosis of Epilepsy
- Analysis of Thalamic and Hippocampal Volume in Patients With MTLE
- Prevention of the CA1-mPFC Pre-Synaptic Plasticity
- Gene Expression Profile in Genetic Epilepsy Models
- Hippocampal Proteomic Profile in TLE
- MicroRNA Expression Profile in Epilepsy
- Genotype-Phenotype Correlation in Dravet Syndrome
- Cytokines in West Syndrome
- Hippocampus Metabolic Alterations in Concordant and Discordant TLE Patients

Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology

Revista de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica
Órgão Oficial Trimestral da Liga Brasileira de Epilepsia

Editor

Fernando Cendes – Departamento de Neurologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas/SP

Editores Associados

André Palmmini – Divisão de Neurologia, Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, PUCRS, Porto Alegre/RS

Elza Marcia Yacubian – Unidade de Pesquisa e Tratamento das Epilepsias, UNIFESP, São Paulo/SP

Fulvio Alexandre Scorza – Neurologia Experimental, UNIFESP, São Paulo/SP

Lauro Wichert Ana – FMUSP, Ribeirão Preto/SP

Conselho Editorial

Áurea Nogueira de Melo – Departamento de Medicina Clínica, Centro de Ciências da Saúde, UFRN, Natal/RN

Bernardo Dalla Bernardina – Università de Verona, Verona/Itália

Carlos Eduardo Silvado – Setor de Epilepsia e Eletroencefalografia, Hospital de Clínicas, UFPR, Curitiba/PR

Cesare Lombroso – Harvard Medical School, Boston/USA

Esper A. Cavalheiro – Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, UNIFESP, São Paulo/SP

Fernando Tenório Gameleira – Programa de Cirurgia de Epilepsia do Hospital Universitário, UFAL, Maceió/AL

Francisco José Martins Arruda – Departamento de Neurofisiologia Clínica, Instituto de Neurologia de Goiânia, Goiânia/GO

Frederick Anderman – Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal/Canadá

Gilson Edmar Gonçalves e Silva – Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina, UFPE, Recife/PE

Íscia Lopes-Cendes – Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas/SP

J. W. A. S. Sander – National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London/UK

Júlio Velluti – Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo/Uruguai

Kazuie Iinuma – Tohoko University, School of Medicine, Seiryomochi/Japan

Marielza Fernandez Veiga – Hospital Universitário “Edgard dos Santos”, UFBA, Salvador/BA

Marilisa Mantovani Guerreiro – Departamento de Neurologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas/SP

Maria Carolina Doretto – Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, Belo Horizonte/MG

Mirna Wetters Portuguese – Divisão de Neurologia, Departamento de Medicina Interna e Pediatria, Faculdade de Medicina, PUCRS, Porto Alegre/RS

Natalio Fejerman – Hospital de Pediatria “Juan P. Garrahan”, Buenos Aires/Argentina

Norberto Garcia Cairasco – Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto/SP

Raul Ruggia – Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Montevideo/Uruguai

Roger Walz – Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário da UFSC; Centro de Cirurgia de Epilepsia de Santa Catarina (CEPESC), Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis/SC

Shlomo Shinnar – Albert Einstein College of Medicine, New York/USA

Solomon L. Moshé – Albert Einstein College of Medicine, New York/USA

Wagner Afonso Teixeira – Serviço de Epilepsia e Eletroencefalografia, Hospital de Base de Brasília, Brasília/DF

Contato:

Dr. Fernando Cendes (Editor)
Departamento de Neurologia – FCM, UNICAMP, Campinas/SP
Rua Gen. Carneiro, 181
80060-900, Campinas, SP, Brasil
<fcendes@unicamp.br>

Editoração eletrônica:

Supernova Editora
Porto Alegre, RS – Fone: (51)3386-1984

Ficha Catalográfica

Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology (Revista de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica) / Liga Brasileira de Epilepsia. – Vol. 1, n. 1 (1995). – Porto Alegre: Serviço de Neurologia do Hospital São Lucas da PUCRS, 1995.

v.; 28 cm; trimestral.

v. 1, 1995 – JLBE: Jornal da Liga Brasileira de Epilepsia

v. 2 a 7 (n. 2, jun. 2001) – Brazilian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology (Jornal Brasileiro de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica)

ISSN 1676-2649

CDD: 616.8
CDU: 616.853(05)
616.8-092(05)
616.8-073(05)

Índice para Catálogo Sistemático:

Epilepsia – Periódicos – 616.853(05);
Neurofisiologia – Periódicos – 616.8-092(05);
Eletroencefalografia – Periódicos – 616.8-073(05);
Eletroencefalografia – Periódicos – 616.8-073(05);
Neurologia – Fisiologia – Periódicos – 616.8-092(05)

(Bibliotecária responsável: Rosária Maria Lúcia Geremia – CRB 10/196)

Summary

*Journal of
Epilepsy and
Clinical
Neurophysiology*

J Epilepsy Clin Neurophysiol 2012;18(2):29-72

ISSN 1676-2649

Editorial / Editorial	33
Message of the President of the Brazilian League of Epilepsy / Mensagem do Presidente da LBE	34
Original Article / Artigo Original	
Long-term prognosis of epilepsy / Prognóstico a longo prazo da epilepsia	35
MM Gomes	
Comparative analysis of thalamic and hippocampal volume in patients with mesial temporal lobe epilepsy responsive or not to drug therapy / Análise comparativa do volume hipocampal e talâmico em pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial com e sem resposta adequada ao tratamento farmacológico	41
TB Leoni, AC Coan, F Cendes	
XXXIV Brazilian Epilepsy Congress – 2012 / XXXIV Congresso Brasileiro de Epilepsia – 2012	
AWARD WORK: EXPANDED ABSTRACT	
Prevention of the CA1-mPFC pre-synaptic plasticity impairments in a post-ictal psychosis model <i>in vivo</i> / Indução prévia de LTP na via CA1-córtex pré-frontal medial de ratos bloqueia os prejuízos de plasticidade pré-sináptica induzidos por modelo de psicose pós-ictal <i>in vivo</i>	45
C Lopes-Aguilar, MT Rossignoli, IM Esteves, RN Ruggiero, LS Bueno Júnior, RN Romcy-Pereira, JP Leite	
EXPANDED ABSTRACTS / RESUMOS EXPANDIDOS	
Gene expression profiling in genetic animal models of provide elements to unveil the molecular mechanisms underlying epileptogenesis in rodents / A caracterização do perfil de expressão gênica em larga escala em modelos genéticos de epilepsia fornece elementos para entender os mecanismos envolvidos na epileptogênese em roedores	50
AHB Matos, VDB Pascoal, DR Nascimento, S Martins, CS Rocha, JF Vasconcellos, MT Chamma, CV Maurer-Morelli, AS Martins, AC Valle, ALB Godard, I Lopes-Cendes	
Hippocampal proteomic profile in temporal lobe epilepsy / Perfil proteômico hipocampal em epilepsia do lobo temporal	53
DS Persike, ML Lima, RP Amorim, EA Cavalheiro, EMT Yacubian, RS Centeno, H Carrete Jr, S Schenkman, M Canzian, MJS Fernandes	
MicroRNA expression profile in epilepsy: breaking molecular barriers / Perfil de expressão de microRNAs em epilepsia: revelando novos mecanismos moleculares	57
DB Dogini, SH Avansini, FR Torres, F Rogério, CS Rocha, R Secolin, CL Yasuda, AC Coan, AF Costa, ACS Piazza, LAMR Reis, LS Queiroz, H Tedeschi, E Oliveira, F Cendes, I Lopes-Cendes	
Genotype-Phenotype correlation in Dravet Syndrome with SCN1A mutation increase efficiency of molecular diagnosis / Correlações entre o genótipo e o fenótipo na síndrome de Dravet com mutações em SCN1A aumentam a acurácia do diagnóstico molecular	60
MC Gonsales, P Preto, MA Montenegro, MM Guerreiro, I Lopes-Cendes	
Cytokines in cerebrospinal fluid of children with West Syndrome / Citocinas no líquido cefalorraquiano de crianças com síndrome de West	63
MA Dias de Sousa, RCF Bonatti, V Rodrigues Jr, DS Azevedo, MHA Santos, ROL Pereira, A Leboeiro-Fernandez	
Metabolic differences in the contralateral hippocampus of concordant and discordant mesial temporal sclerosis (MTS) patients: evaluation with proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) / Diferenças metabólicas no hipocampo contralateral entre pacientes concordantes e discordantes na esclerose mesial temporal (EMT): avaliação com espectroscopia de prótons por ressonância magnética (1h-ERM)	67
SC Nascimento, EJ Park, KP Lyra, RM Valério, CL Rosa, V Passarelli, H Castro-Lima, CC Leite, MCG Otaduy	
Courses, Symposia & Seminars / Cursos, Simpósios & Seminários	70
Guidance for Authors / Normas para Autores	71

Liga Brasileira de Epilepsia – 2010-2012

Presidente

Luciano De Paola, Curitiba/PR

Tesoureiro

Carlos Eduardo Soares Silvado, Curitiba/PR

Secretário

Sergio Antoniuk, Curitiba/PR

Secretária Executiva

Maria Luiza G. de Manreza, São Paulo/SP

Endereço (Diretoria Executiva)

Liga Brasileira de Epilepsia
Rua Teodoro Sampaio, 741 cj. 94 – Fone/Fax: (11)3085-6574
CEP 05405-050 – São Paulo – SP

Conselho Fiscal

Elza Márcia Yacubian, São Paulo/SP
Wagner Afonso Teixeira, Brasília/DF
Lauro Wichert-Ana, Ribeirão Preto/SP
Luiz Athaide Jr., Recife/PE
Carlos Silvado, Curitiba/PR

Conselho Consultivo

Wagner Afonso Teixeira (Presidente LBE 2008-2010)
Fernando Cendes (Presidente LBE 2006-2008)
Magda Lahorgue Nunes (Presidente LBE 2004-2006)
Américo C. Sakamoto (Presidente LBE 2002-2004)
Carlos Silvado (Presidente LBE 2000-2002)

Comissão Aspectos Legais

Carlos Silvado, Curitiba/PR (Coordenador)
Kette Valente, São Paulo/SP
Carlos Campos, São Paulo/SP
Luiz Athaide Jr., Recife/PE
Lauro Wichert-Ana, Ribeirão Preto/SP

Comissão Científica

João Pereira Leite, São Paulo (Coordenador)
Jaderson Costa da Costa, Porto Alegre/RS
Norberto Garcia Cairasco, Ribeirão Preto/SP
Luis Eugênio Mello, São Paulo/SP
Fernando Cendes, Campinas/SP

Comissão de Neuropsicologia

Mirna Portuguese, Porto Alegre/RS (Coordenadora)
Sabine Marroni, Porto Alegre/RS
Daniel Fuentes, São Paulo/SP
Maria Joana Mader, Curitiba/PR
Andréa Alessio, Campinas/SP

Comissão Tratamento Cirúrgico da Epilepsia

Carlos Silvado, Curitiba/PR (Coordenador)
Américo Sakamoto, Ribeirão Preto/SP
André Palmieri, Porto Alegre/RS
Luciano de Paola, Curitiba/PR
Luis Henrique Martins Castro, São Paulo/SP
Elisana Garzon, São Paulo/SP

Comissão de Drogas Antiepilépticas (DAES)

Veriano Alexandre Jr., Ribeirão Preto/SP (Coordenador)
Carlos Guerreiro, Campinas/SP
Elza Márcia Yacubian, São Paulo/SP
Maria Luiza Manreza, São Paulo/SP

Comissão Epidemiologia Clínica

Marleide da Mota Gomes, Rio de Janeiro (Coordenadora)
Li Li Min, Campinas/SP
Moacir Alves Borges, São José do Rio Preto/SP
Valentina Carvalho, Recife/PE

Comissão Epilepsia na Infância

Magda Lahorgue Nunes, Porto Alegre/RS (Coordenadora)
Rosa Valério, São Paulo/SP
Aurea Nogueira de Mello, Natal/RN
Marilisa Guerreiro, Campinas/SP
Kette Valente, São Paulo/SP

Comissão de Neurofisiologia Clínica

Regina Maria Fernandes, Ribeirão Preto/SP (Coordenadora)
Andrea Julião de Oliveira, Belo Horizonte/MG
Vera Cristina Terra, Ribeirão Preto/SP
Carlos Silvado, Curitiba/PR
Jaderson Costa da Costa, Porto Alegre/RS

Comissão de Ensino

Li Li Min, Campinas/SP (Coordenador)
Lucas Vilas Boas Magalhães
Paula T. Fernandes, Campinas/SP

Comissão Revista de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica

Fernando Cendes, Campinas/SP (Editor)

Capítulos da LBE – Biênio 2010-2012

Capítulo da Bahia

Presidente: Marielza Fernández Veiga
Secretária: Camila Souza Alves Cosmo
Tesoureiro: Francisco Monteiro Meneses

Capítulo do Distrito Federal/Goiás

Presidente: Wagner Afonso Teixeira
Secretário: Francisco Arruda
Tesoureiro: Paulo Ragazzo

Capítulo de Minas Gerais

Presidente: Maria Carolina Doretto
Secretaria: Andréa Julião de Oliveira
Tesoureiro: Luiz Fernando Fonseca

Capítulo de Paraná

Presidente: Luciano De Paola
Secretário: Carlos Silvado
Tesoureiro: Sergio Antoniuk

Capítulo de Pernambuco

Presidente: Adélia Henriques Souza
Secretária: Valentina Nicole Carvalho
Tesoureiro: Ricardo Amorim

Capítulo do Rio de Janeiro

Presidente: Eduardo de Sá Campello Faveret
Secretaria: Heloisa Viscaíno F. S. Pereira
Tesoureira: Rosiane da Silva Fontana

Capítulo do Rio Grande do Sul

Presidente: Marta Hemb
Secretária: Alessandra Marques Pereira
Tesoureira: Danielle Irigoyen da Costa

Capítulo de Santa Catarina

Presidente: Katia Lin
Secretária: Lucia Sukys Claudino
Tesoureira: Maria Alice Horta Bicalho

Capítulo de São Paulo

Presidente: Regina Maria França Fernandes
Secretária: Vera Cristina Terra
Tesoureiro: Lauro Wichert-Ana

WEBSITE:

<http://www.epilepsia.org.br/epi2002/capitulos.asp>

Esta edição de junho 2012 traz uma revisão sobre prognóstico de epilepsia em longo prazo e um artigo original sobre volume hipocampal e talâmico em dois grupos de pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial – com e sem resposta adequada a drogas antiepilépticas (DAEs), mostrando que atrofia hipocampal ocorre também no grupo de pacientes com crises controladas e que a atrofia de tálamo ipsilateral ao foco epileptogênico está correlacionada com a idade dos pacientes.

Este número do JECN traz ainda o resumo expandido do trabalho vencedor do Prêmio Aristides Leão durante o Congresso Brasileiro de Epilepsia de 2012 em Ribeirão Preto, que demonstra a excelente qualidade dos jovens pesquisadores brasileiros na área de epileptologia.

Boa leitura!

Fernando Cendes
Editor, JECN

Message of the President of the Brazilian League of Epilepsy

P rezados colegas,

Saudações! Efetivado o rito burocrático de transição das Diretorias anterior e atual da LBE, iniciamos efetivamente nosso turno atuando inicialmente em dois fronts distintos:

1. Seguem adiantados os trabalhos de composição das novas comissões de trabalho da LBE para o Biênio 2012-2014. As comissões estão praticamente todas formatadas, tendo sido realizadas adequações nas comissões tradicionais e a introdução de algumas novas, em conformidade com demandas próprias das áreas em desenvolvimento em nossa sociedade. São exemplos as inéditas Comissão de Comportamento e Cognição, Comissão de Trabalho, Esporte e Lazer e a Comissão de Neuromodulação. Para o próximo número do JECN esperamos tê-las anunciadas, estruturadas e atuantes.
2. Após negociações conduzidas nas últimas semanas é com prazer que informamos data e local de nosso próximo congresso nacional. O 35 Congresso da Liga Brasileira de Epilepsia será realizado em Foz do Iguaçu/Paraná, entre os dias 4 e 6 de abril de 2014. Nossa Diretoria pretende buscar a fusão perfeita entre as belezas naturais de Foz e sua capacidade de entretenimento com um programa científico de elevado nível, apresentado em roupagem nova e instigante a discussão participativa entre os presentes;

Aproveito ainda a oportunidade para felicitar os colegas Fernando Cendes e João Pereira Leite na primeira edição de editorial compartilhado de nosso jornal. Sucesso!

Atenciosamente,

Luciano De Paola

Presidente da Liga Brasileira de Epilepsia
Gestão 2012-2014

Prognóstico a Longo Prazo da Epilepsia*

Marleide da Mota Gomes

Instituto de Neurologia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO

Vários estudos antes da década de 1970 sobre pessoas com epilepsia (PCE) reportam o seu mau prognóstico. Este trabalho foi desenvolvido para desenvolver o conhecimento atual deste tema através de uma revisão narrativa baseada principalmente em estudos de coorte prospectivos ou retrospectivos populacionais em PCE recentemente diagnosticadas, período de acompanhamento de pelo menos de 10 anos, sendo a variável de desfecho a remissão ou recorrência das crises epiléticas (CE), além da morte. Também é considerado o padrão de remissão, de recidiva ou agravamento de epilepsia, em PCE farmacorresistentes. Na maioria das PCE recém-diagnosticadas, principalmente de origem idiopática, o prognóstico a longo prazo da epilepsia é favorável, mas epilepsia permanece ativa em cerca de 30% e torna-se farmacorresistente em aproximadamente 10%. Reconhece-se também que as PCE têm um risco aumentado de morte prematura, sendo o risco maior logo após o início das CE.

Unitermos: epilepsia, prognóstico, acompanhamento de longo prazo, epidemiologia.

ABSTRACT

Long-term prognosis of epilepsy

Several studies before the 1970's about patients with epilepsy reported bad prognosis. This paper was developed to know the knowledge about it at nowadays. This was made by a narrative review mainly based on populational prospective/retrospective cohort study on patients with newly diagnosed epilepsy, follow-up period at least of 10 years, outcome variable being remission or recurrence of seizures, besides death. It is also considered the pattern of remission-relapse or worsening of epilepsy in people with pharmacoresistant epilepsy. In most people with newly diagnosed epilepsy, mainly idiopathic etiology, the long-term prognosis of epilepsy is favorable, but epilepsy remains active in approximately 30% and becomes intractable in approximately 10%. It is also recognized that people with epilepsy have an increased risk of premature death, being the highest risk soon after onset of seizures.

Keywords: epilepsy, prognosis, long-term follow-up, epidemiology.

INTRODUÇÃO

A epilepsia é a doença neurológica grave mais comum, e a prevalência de epilepsia ativa é de cerca de 5-7,1 por 1000 em estudos realizados nos EUA, por exemplo, e pode ser mais elevada, principalmente nos países em desenvolvimento.¹ No que diz respeito às taxas de

incidência específicas por idade, têm havido mudanças, com uma redução nos grupos mais jovens e um aumento em pessoas acima dos 60 anos, pelo menos nos países desenvolvidos.¹ No entanto, apesar de ser apresentada como uma entidade nosológica, a epilepsia não é uma doença única. Esta reflexão tem também base nos ensaios de classificação e terminologia propostos recentemente

* Este trabalho foi parcialmente apresentado na mesa sobre "Risco na epilepsia", do XXXIV Congresso Brasileiro de Epilepsia, realizado em Ribeirão Preto em 06-09 de junho, 2012.

Received June 10, 2012; accepted June 20, 2012.

pela Liga Internacional contra a Epilepsia. Berg e Scheffer² propuseram que a estrutura organizacional para epilepsia pode se basear em critérios do mais para o menos específico, em síndromes eletroclínicas e constelações, em epilepsia não síndrômica com causas específicas ou desconhecidas. Intrinsecamente, esta proposta classificatória também é uma demonstração da grande variabilidade prognóstica da epilepsia. Além disso há várias armadilhas metodológicas a serem enfrentadas sobre estudos prognósticos. O estudo prognóstico de qualquer doença, incluindo a epilepsia, pode advir de coortes potencialmente não representativas populacionalmente, ou com grandes perdas de sujeitos no acompanhamento. Neste artigo, são privilegiados trabalhos recentes (publicação nos últimos seis anos), fundamentados em estudos populacionais de coorte inicial, além de obras pioneiras. O objectivo principal é o de determinar o prognóstico de pessoas com epilepsia (PCE) recém-diagnosticadas e acompanhadas a longo prazo (10 anos ou mais) para estudar a remissão de suas crises epiléticas (CE) ou morte.

HISTÓRIA

Antes do advento de tratamentos efetivos e compreensão etiológica das doenças, o objetivo principal da medicina ocidental não foi o de curar o paciente, mas sim diagnosticar a doença e estimar um prognóstico satisfatório do paciente. Após, com a evolução terapêutica, os esforços se dirigiram para a cura de doenças. Essa mudança pode ser representada pela Figura 1, onde o prognóstico na literatura médica é limitado em comparação com o diagnóstico, e ainda menos, com a terapêutica.

Quanto à relevância antiga da abordagem prognóstica na clínica, lembramos de aforismos de Hipócrates³ relativos à epilepsia. Eles enfatizavam a impressão do prognóstico melhor dos mais jovens (com epilepsia idiopática?) do que dos mais velhos com epilepsia (epilepsia sintomática, principalmente aguda?): “Sobre a epilepsia em jovens, é mais frequentemente removida por mudanças do ar, de país, e de modos de vida”, e “os casos de epilepsia que venham antes da puberdade podem sofrer uma mudança, mas as que vêm depois de 25 anos de idade, na maior parte terminam em morte”³.

No século XIX, na Escola Britânica de epileptologia hegemônica, as evidências sobre o prognóstico foram dadas pelo neurologista John Russell Reynolds (1828-1896) em pelo menos dois dos capítulos de seu livro *Epilepsy: its symptoms, treatment, and relation to other chronic convulsive diseases* (1861).⁴ No seu capítulo 5, sobre a história natural da epilepsia, Reynolds pergunta se, naquele momento, haveria dados suficientes para defini-la, pois “casos são tão profundamente comprometidos pelo tratamento”, uma afirmação que melhor se encaixa nos dias de hoje, porque a primeira droga antiepilética (DAE) reconhecida como eficaz só foi utilizada em 1860, ou melhor, a partir de 1912, com o fenobarbital. Em outro capítulo (7º, prognóstico), Reynolds começou com as citações antagônicas, uma por Tissot (J'en ai Guerri un très grand nombre), e outro por Delaniauve (Elle conduit presque infailliblement à l'incurabilité par de lentes dégradations).⁴ Outro neurologista britânico, William R. Gowers (1845-1915) publicou em seu livro (*Epilepsy and Other Chronic Convulsive Diseases*-1881) questões prognósticas.⁵

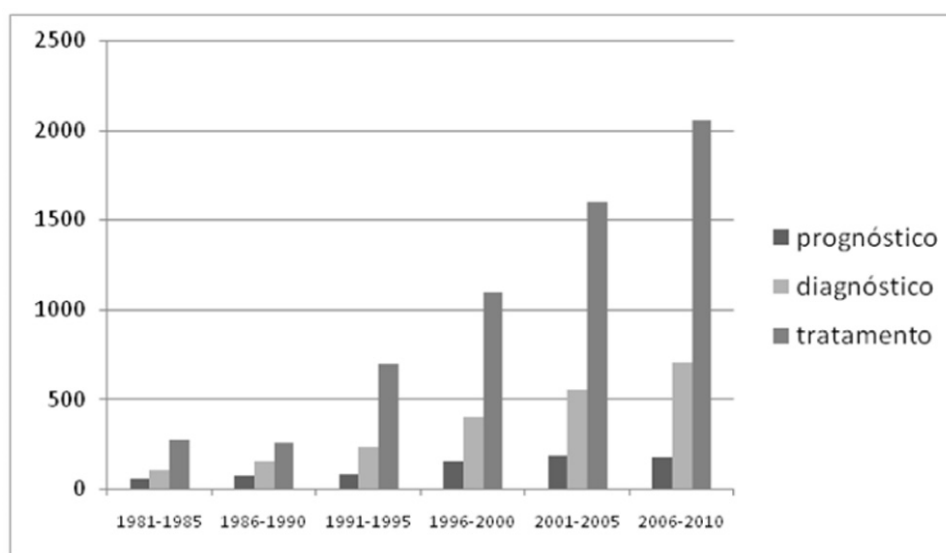


Figura 1. Representatividade de trabalhos sobre prognóstico na literatura médica, em comparação aos sobre diagnóstico e terapêutica (Busca Pubmed 28.05.2012: prognosis/diagnosis/treatment[title/abstract] AND epilepsy[title]).

Ele mencionou, por exemplo, o prognóstico desfavorável da epilepsia “pós-hemiplégica” em relação a casos idiopáticos. Gowers também considerou que o melhor prognóstico foi inversamente relacionado com a duração da doença, e que 70% dos seus pacientes tornaram-se livres de CE por pelo menos 1 ano quando tratados com brometo pela primeira vez.^{5,6}

Juliano Moreira (1873-1932), o pai da psiquiatria científica brasileira, expressa os preconceitos dominantes da Neuropsiquiatria da época sobre as PCE (1912)⁷: 1 – “Os desfechos da vida colonial em Bielefeld são que ela cura um sexto dos epiléticos hospitalizados, melhora 40% e impede que os outros pacientes não melhorados enlouqueçam ou caiam em demência”; 2 – “Não vem ao caso discutir se é uma ou se é múltipla a epilepsia: basta lembrar que os epiléticos fornecem um vasto contingente à legião de criminosos de todas as classes...”. Quanto aos livros especificamente sobre o prognóstico da epilepsia, o último foi o escrito por Jallon (2003)⁸ como editor principal, e o anterior por Rodin (1968).⁸ O ponto de vista deste último foi baseado em amostras enviesadas com desfechos desfavoráveis. O livro editado por Jallon tem como primeiro capítulo o tema metodologia que enfatiza os princípios de estudos de prognóstico⁹.

METODOLOGIA

A apreciação crítica de um estudo de prognóstico envolve algumas questões básicas, como as arroladas por Geddes¹⁰: *a análise da amostra do estudo* (representatividade, definição clara da amostra e com sujeitos selecionados em um ponto similar no curso de sua doença); *seguimento* (acompanhamento suficientemente longo e completo), *desfechos* (definição dos desfechos e de sua utilidade na clínica. Identificação de fatores prognósticos e confiabilidade de sua estimativa). Nesta seção, destacam-se as questões sobre o desenho do estudo, desfechos, fatores prognósticos e acompanhamento.

Um projeto mais adequado sobre prognóstico capta uma amostra de uma população em risco de epilepsia e identifica uma coorte inicial que é um grupo identificado no início da epilepsia, com seguimento prospectivo. A obtenção de uma coorte representativa é o grande problema em projetar estudos válidos sobre o prognóstico da epilepsia. Os estudos de coortes podem ser prospectivos ou retrospectivos (históricos). Nos retrospectivos, os pacientes são identificados em um ponto no passado e as informações são coletadas sobre seus desfechos posteriormente, ao contrário do prospectivo, onde a identificação é no presente com acompanhamento *a posteriori* (Figura 2).

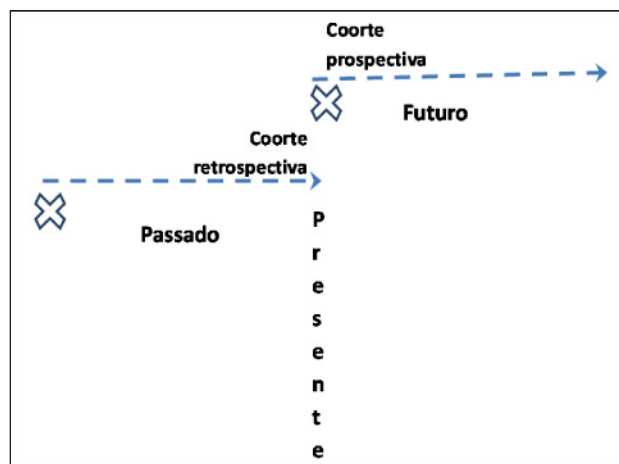


Figura 2. Coortes retrospectivas (históricas) vs prospectivas.

Dentre esses estudos, os estudos de coorte prevalentes de casos existentes tendem a sobre-representar as pessoas com casos antigos e complexos, e podem, portanto, fornecer estimativas prognósticas excessivamente pessimistas. Ao contrário, os estudos de coorte incidente (coorte de início), de casos novos, são mais representativos (vide Figura 3).

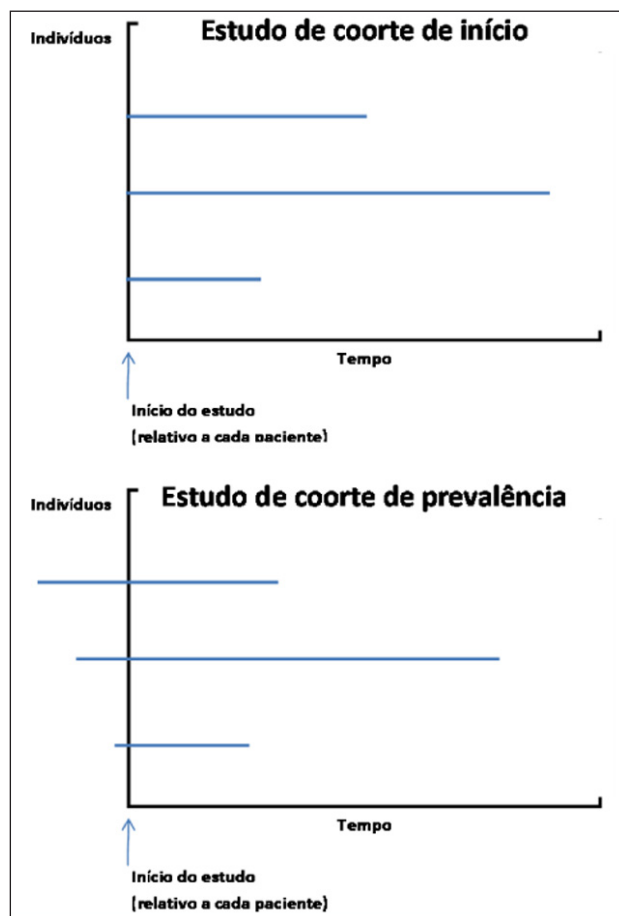


Figura 3. Estudos de coorte incidente (de início) ou prevalente.

A Figura 4 representa desfechos, fatores prognósticos e acompanhamento por meio de uma curva de sobrevivência, bem como o método de Kaplan-Meier que é frequentemente usado para analisar os desfechos em relação ao tempo.

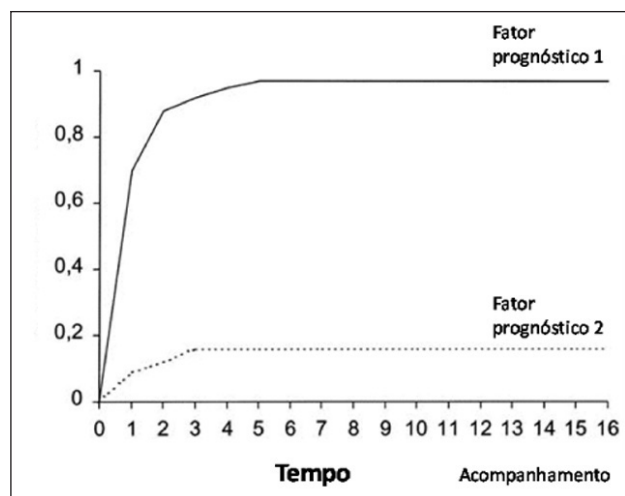


Figura 4. Kaplan-Meier e sua representação gráfica por meio de uma curva de sobrevivência, com destaque para o desfecho (p. ex., remissão ou não das CE), fatores prognósticos (p. ex., epilepsia sintomática ou epilepsia idiopática) e acompanhamento (p. ex., em anos).

Os desfechos mais comumente estudados em estudos a longo prazo de epilepsia são morte e remissão. A remissão foi definida como ausência de CE; remissão precoce, remissão dentro de 12 meses de tratamento; remissão tardia, remissão após 12 meses de tratamento; remissão terminal, remissão ao final do seguimento; recidiva, duas ou mais CE após a remissão; resistência às DAE, não há remissão nunca.⁶ Mais particularmente, se definem esses desfechos em relação ao tempo de ocorrência e duração da remissão categorizada como 1 ano de remissão em qualquer momento, 2 anos de remissão em qualquer momento, 2 anos remissão terminal, 5 anos de remissão em qualquer momento (5ARQM) ou 5 anos de remissão terminal (5ART). Os desfechos em estudos de prognóstico são geralmente expressos como médias ou frequências/porcentagens por grupo.

As mortes foram geralmente apresentadas como razão de mortalidade padronizada – RMP (taxa que difere de uma bruta por ter sido padronizada para uma população diferente, usualmente para uma população padrão, para remover a influência de variáveis externas, como idade). Para facilitar a compreensão como a epilepsia pode se comportar, é necessário conhecer os seus fatores prognósticos, como a etiologia e tipo de epilepsia, que podem indicar a eficácia do tratamento e os desfechos. Quanto ao acompanhamento, ele tem que ser suficientemente longo para ter a oportunidade de registrar o(s) desfecho(s) esperado(s). Na epilepsia, os estudos podem ser divididos

em curto-médio prazo e longo prazo. Neste artigo, o ponto de corte é ≥ 10 anos de acompanhamento para a seleção dos estudos de prognóstico a longo prazo de epilepsia, como feito por Neligan.¹¹

ESTUDOS A LONGO PRAZO

Os estudos prognósticos de PCE mais comumente realizados foram os de avaliação das fases iniciais de sua doença e dos fatores preditivos de remissão precoce. Nesta revisão, privilegiamos os estudos longitudinais de PCE com inclusão de todos os casos incidentes de epilepsia precoce em populações definidas. Poucos estudos avaliaram o prognóstico a longo prazo da epilepsia, de acordo com a definição aqui aplicada. Três grupos principais trabalharam nesse assunto: o primeiro baseado em Rochester/Columbia University-EUA,¹² outro em Turku, na Finlândia, sobre crianças,^{13,14} e o terceiro no Reino Unido através do Estudo Nacional de Prática Geral de Epilepsia/NGPSE – UK.^{11,15,16} A maioria desses estudos são de coorte retrospectiva e em populações pediátricas com epilepsia.¹¹ O estudo de populações adultas é menor que a pediátrica, menos ainda em epilepsia fármaco-resistente (estudados separadamente nesta seção). Os estudos mais consistentes metodologicamente de prognóstico a longo prazo em epilepsia são apresentados logo a seguir com base na revisão de Nelligan,¹¹ de acordo com o autor/ano de publicação/país, N, seguimento/ano, 5ART (%), 5ART fora DAE (%), desenho do estudo: 1 – Annegers et al. 1979/Rochester-EUA, 457, 20, 70%, 50%, coorte incidente histórica; 2 – Okuma et al. 1981/Japão, 868, 10, 58,3%, –, estudo multi-institucional retrospectivo (Pediatria); 3 – Brorson e Wranne, 1987/Suécia, 194, 12, 64%, 40%, retrospectivo (Pediatria); 4 – Oka et al. 1989 / Okayama-Japão, 730, 10-15, 79,1%, –, Retrospectivo (Pediatria); 5 – Wakamoto et al. 2000/Japão, 143, 18,9, 62,8%, 54,7%, retrospectivo (Pediatria); 6 – Lindsten et al. 2001/Suécia, 107, 10, 64%, 17,5%, prospectivo (Todos >17 anos); 7 – Sillanpää e Schmidt, 2006/Turku-Finlândia, 144, 40, 67%, 58%, prospectivo (Pediatria); 8 – Geerts et al. 2010/Holanda, 413, 14,8, 70,9%, 61,9%, Prospectivo (Pediatria). Os estudos do NGPSE apresentados por Nelligan et al.^{11,16} propõem-se a examinar o prognóstico a longo prazo, depois de 25 anos em um estudo prospectivo de coorte incidente, em relação a desfechos de mortalidade precoce e CE.^{11,16} A população estudada incluiu mais de 1000 pessoas: 564 tendo CE definidas; 228, CE possíveis; 220, convulsões febris. O NGPSE é o maior estudo prospectivo a longo prazo das PCE, com a maior proporção de pessoas em remissão terminal (80,6% em PCE definida e 86,6% naqueles com epilepsia possível). Como mencionado por Neligan,¹¹ em parte esses resultados são devidos ao longo período de acompanhamento, inclusão de pessoas

com CE únicas e CE agudas sintomáticas. No entanto, a remissão pode ser vista com frequência no início.¹¹ Nos casos pediátricos relatados por Schmidt e Sillanpää,⁶ a remissão ocorreu em mais de 90% das epilepsias idiopáticas da infância e em crianças neurologicamente normais com epilepsia e CE pouco frequentes, mas também, em várias outras circunstâncias. Esses estudos são os mais longos sobre crianças com epilepsia, realizados em Turku-Finlândia.¹³ Em conclusão, a metade dos PCE de início na infância, eventualmente entrará em remissão terminal sem recidiva, e um quinto, depois de recidiva. Um terço terá um desfecho a longo prazo pobre em termos de CE persistentes após a remissão ou sem nunca ter tido remissão. Esses dados indicam que quanto mais tempo com CE pré-remissão, mais longo o tempo para atingir cinco anos de remissão. Mais particularmente, os estudos de países pobres baseados em coortes prevalentes sugerem que pelo menos um terço das PCE entram em remissão espontânea.^{11,17} Mais comentários sobre o estudo prévio de Sillanpää e Schmidt¹⁴ são feitos no parágrafo seguinte sobre os padrões de resistência às DAE.

Aqui, apresentam-se os casos de PCE que não entram em remissão a longo prazo, nos primeiros anos após o diagnóstico, os chamados farmacorresistentes e seu padrão heterogêneo a longo prazo (curso remissão-recidiva ou agravamento).^{6,18} Mesmo entre aqueles pacientes que respondem aos tratamentos iniciais, a recorrência não é incomum, e um padrão de remissão-recidiva é reconhecido. Nós podemos endossar isso com dois estudos de coorte de PCE farmacorresistente: de crianças, de Schmidt e Sillanpää⁶ e, outra, de adultos, de Callaghan et al.¹⁹ Sillanpää e Schmidt¹³ em seu estudo com 40 anos de seguimento, demonstraram um padrão de remissão e recidiva em PCE refratária: um subgrupo de 19% dos pacientes entraram em remissão terminal seguindo uma recidiva após a remissão precoce ou tardia (padrão remissão-recorrência), e outros 14% dos pacientes não entraram em remissão após recidiva, o que indica agravamento da epilepsia. Na população adulta com epilepsia farmacorresistente e CE frequentes, o estudo prospectivo de Callaghan et al.¹⁹ estimou a probabilidade cumulativa de 12 meses de remissão de 34,6% em 7 anos, no entanto, o risco de recidiva depois de um período de 12 meses de remissão foi de 71,2% em 5 anos. Surpreendentemente, nos últimos 50 anos não parece ter havido melhora prognóstica substancial dos pacientes em uso de DAE⁶, e, também, a influência do tratamento no prognóstico a longo prazo ainda não é conhecido.¹¹

Quanto aos pacientes com convulsões febris, o estudo de Neligan et al.¹⁵ revelou que 6% desenvolveram epilepsia, sendo o este risco no grupo ao longo de todo o período de acompanhamento quase 10 vezes maior do que na população em geral (taxas de incidência padronizadas – TIP 9,7, IC 95%: 5,7-16,4). As TIP foram significativamente aumentadas nas faixas etárias 0-14 anos, mas não na 15-19

anos. Outra constatação foi a de que nas crianças em quem a convulsão febril índice não foi a primeira crise (“crise que levou o médico de família a suspeitar de CE e registrar o indivíduo no estudo”) o risco de recorrência de CE era maior.

Em relação à mortalidade, é comumente apresentado na literatura que as PCE têm um risco aumentado de morte prematura. Para Neligan et al.¹⁶ o risco é mais elevado logo após o início das CE. No entanto, em países com poucos recursos este risco não foi definido no início da epilepsia, mas mais tarde.^{6,17} A pneumonia (RMP 6,6, IC 95%: 5,1-8,4) foi uma causa comum de morte com uma taxa de mortalidade padronizada consistentemente elevada em todo o seguimento de acordo com Neligan et al.¹⁶ A RMP para a doença cardíaca isquêmica foi significativamente elevada, pela primeira vez nos últimos cinco anos de acompanhamento (3,3, IC 95%: 1,6-7,0). O risco de morte prematura permanece significativamente elevado 20-25 anos após a CE índice, apesar da maior parte do grupo estar em remissão terminal (5 anos ou mais sem CE, com ou sem DAE). No entanto, este estudo incluiu pacientes com CE agudas sintomáticas¹⁶ que têm uma maior mortalidade precoce e um menor risco de CE subsequente não provocada. Hesdorffer et al.²⁰ rejeitam a inclusão destes casos como epilepsia devido a estes desfechos. Em relação à morte como desfecho, Schmidt e Sillanpää⁶ constataram que a epilepsia de início na infância estava associada a um risco substancial de morte relacionada à epilepsia, incluindo a SUDEP. Sendo este risco especialmente alto entre as crianças que não estavam em remissão. Esta não é a constatação de Neligan et al.¹⁶: “Poucas pessoas morreram de causas relacionadas à epilepsia... três de estado de mal epilético, três de acidentes e afogamento, e um por morte súbita e inexplicada na epilepsia”. Comparando os estudos maiores a longo prazo sobre mortalidade, do Reino Unido e da Finlândia, há diferenças importantes, como Schmidt e Sillanpää⁶ relataram: mortalidade mais elevada no estudo do Reino Unido e baixa no finlandês. Uma possível explicação para a diferença é a inclusão de casos agudos sintomáticos e pacientes mais velhos, e também muitas mortes por câncer que não estão associadas às CE, fatos acontecidos no primeiro estudo. Além disso, há uma diferença em relação à averiguação da causa do óbito: estudo do Reino Unido se baseia em declaração de óbito, muitas vezes originários de médicos de clínica geral; e o finlandês foi baseado principalmente em exames *post mortem*.

O prognóstico para a remissão da epilepsia é ruim em pacientes com disfunção neurológica associada desde o nascimento. Pacientes com CE idiopáticas diagnosticadas antes dos 10 anos de idade têm a probabilidade de remissão maior. O prognóstico é menos favorável para aqueles com CE parciais complexas e epilepsia de início na fase adulta. Preditores negativos da remissão de CE incluem também retardo do desenvolvimento, síndrome de epilepsia

generalizada sintomática, duração da intratabilidade e número de DAE não eficazes. Vários destes achados demonstrados no estudo de Annegers et al.¹² e de Callangham et al.¹⁹ foram reforçadas por muitos outros como Neligan¹¹.

Quanto ao prognóstico de um tipo específico de epilepsia, pode-se citar um trabalho recentemente publicado por Camfield e Camfield²¹ sobre 24 PCE mioclônica juvenil da Nova Escócia/Canadá. Os 25 anos de seguimento foram baseados em uma coorte retrospectiva populacional de crianças que desenvolveram epilepsia antes dos seus 16 anos de idade. Todas as CE cessaram em 17% e 13%, apenas as mioclonias persistiram.

Neligan et al.¹⁸ fizeram uma síntese didática dos padrões de evolução dos pacientes com o início das CE e seus desfechos: remissão a longo prazo desenvolvida dentro de 5 anos do início (~60%); padrão contínuo ou recidiva nos 5 anos de início (~40%). Estes últimos casos teriam: remissão a longo prazo desenvolvida >5 anos após o início (~10%), ou padrão contínuo (nenhum período de remissão ~20%) ou intermitente (epilepsia ativa com períodos de remissão ~10%).

CONCLUSÕES

O prognóstico a longo prazo é satisfatório para a maioria dos PCE, talvez mais do que esperávamos antes dos estudos confirmatórios mais atuais. No entanto, um terço deles será farmacorresistente com remissão instável/recidiva ou agravamento na evolução, um padrão mais complexo do que se pensava anteriormente. A longo prazo, o risco de mortalidade prematura permanece significativamente elevado, apesar da maioria das pessoas atingem a remissão terminal. No entanto, há poucos estudos de prognóstico a longo prazo com estudos de coorte, menos ainda em adultos, e, também, de estudos com estratificação por etiologia e síndrome epiléptica para os achados mais recentes. As principais metas para se fazer este tipo de estudos são de se reconhecerem os fatores de risco modificáveis e medidas terapêuticas melhores, ainda mais em face ao prognóstico inalterado nos últimos 50 anos, apesar do uso de DAE recém-desenvolvidas.

REFERÊNCIAS

- Banerjee PN, Filippi D, Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. *Epilepsy Res.* 2009;85(1):31-45.
- Berg AT, Scheffer IE. New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. *Epilepsia.* 2011;52(6):1058-62.
- Hippocrates. Translated by Francis Adams <<http://ebooks.adelaide.edu.au/h/hippocrates/aphorisms/>>.
- Reynolds JR. Epilepsy: its symptoms, treatment, and relation to other chronic convulsive diseases, 1861 [cited 2012 June 18]. Available from: <http://books.google.com.br/books/about/Epilepsy.html?id=-7xrAAAAMAAJ&redir_esc=y>.
- Gowers WR. Epilepsy and Other Chronic Convulsive Diseases, 1881 [cited 2012 June 18]. Available from: <<http://books.google.com.br/books?id=zORhrtOwBcwC&q=Gowers+WR.+Epilepsy+and+Other+Chronic+Convulsive+Diseases,&dq=Gowers+WR.+Epilepsy+and+Other+Chronic+Convulsive+Diseases,&hl=pt-BR&sa=X&ei=DN3fT7esBli69QSlj5mTDQ&ved=0CDUQ6AEwAA>>.
- Schmidt D, Sillanpää M. Evidence-based review on the natural history of the epilepsies. *Curr Opin Neurol* 2012;25(2):159-63.
- Moreira J. Assistência aos epiléticos: colônias para eles. *Arquivos Brasileiros de Psiquiatria, Neurologia e Ciências Afins.* 1905;167-82.
- Jallon P, Berg A, Dulac O, Hauser A. Prognosis of Epilepsies. Montrouge: John Libbey Eurotext Ltd, 2003, [cited 2012 June 18]. Available from: <http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Zlfh64EENqYC&oi=fnd&pg=PA3&dq=Jallon+Prognosis+of+Epilepsies.+Montrouge:+John+Libbey+Eurotext+Ltd,+2003.&ots=FQX8Wti0Ja&sig=zS2qRTCzBsU4_GPdVjGE0ySkSbY#v=onepage&q&f=false>.
- Hesdorffer DC, Logroscino G. Methods in prognosis studies. In *Prognosis of Epilepsies* edited by Jallon P, Berg A, Dulac O, Hauser A. Montrouge: John Libbey Eurotext Ltd, 2003, 3-11 [cited 2012 June 18]. Available from: <http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Zlfh64EENqYC&oi=fnd&pg=PA3&dq=Jallon+Prognosis+of+Epilepsies.+Montrouge:+John+Libbey+Eurotext+Ltd,+2003.&ots=FQX8Wti0Ja&sig=zS2qRTCzBsU4_GPdVjGE0ySkSbY#v=onepage&q&f=false>.
- Geddes J. Answering clinical questions about prognosis. *Evid Based Mental Health.* 2000;3:100-1.
- Neligan A. The long-term prognosis of epilepsy. Thesis. A thesis submitted to University College London for the degree of Doctor of Philosophy 2011.
- Annegers JF, Hauser WA, Elveback LR. Remission of seizures and relapse in patients with epilepsy. *Epilepsia* 1979;20:729-37.
- Sillanpää M, Schmidt D. Natural history of treated childhood-onset epilepsy: prospective, long-term population-based study. *Brain.* 2006;129:617-24.
- Sillanpää M, Shinnar S. Long-term mortality in childhood-onset epilepsy. *N Engl J Med.* 2010;363(26):2522-9.
- Neligan A, Bell GS, Giavasi C, Johnson AL, Goodridge DM, Shorvon SD, Sander JW. Long-term risk of developing epilepsy after febrile seizures: a prospective cohort study. *Neurology.* 2012;78(15):1166-70.
- Neligan A, Bell GS, Johnson AL, Goodridge DM, Shorvon SD, Sander JW. The long-term risk of premature mortality in people with epilepsy. *Brain.* 2011;134(Pt 2):388-95.
- Hesdorffer DC. The Natural History of Epilepsy: Spontaneous Remission and Mortality. *Epilepsy Curr.* 2010;10(3):55-6.
- Neligan A, Bell GS, Sander JW, Shorvon SD. How refractory is refractory epilepsy? Patterns of relapse and remission in people with refractory epilepsy. *Epilepsy Res.* 2011;96(3):225-30.
- Callaghan B, Schlesinger M, Rodemer W, Pollard J, Hesdorffer D, Hauser WA, French J. Remission and relapse in a drug-resistant epilepsy population followed prospectively. *Epilepsia.* 2011;52(3):619-26.
- Hesdorffer DC, Benn EK, Cascino GD, Hauser WA. Is a first acute symptomatic seizure epilepsy? Mortality and risk for recurrent seizure. *Epilepsia.* 2009;50:1102-8.
- Camfield CS, Camfield PR. Juvenile myoclonic epilepsy 25 years after seizure onset: a population-based study. *Neurology.* 2009;73(13):1041-5.

Endereço para correspondência:

Marleide da Mota Gomes
Programa de Epilepsia do Instituto de Neurologia Deolindo Couto
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Av. Venceslau Braz, 95
CEP 22290-140, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
E-mail: <mmotagomes@acd.ufrj.br>

Análise Comparativa do Volume Hipocampal e Talâmico em Pacientes com Epilepsia de Lobo Temporal Mesial com e sem Resposta Adequada ao Tratamento Farmacológico

Tauana B. Leoni^a, Ana C. Coan^a, Fernando Cendes^a

Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

RESUMO

Objetivo: Verificar variação no volume hipocampal e talâmico entre pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM) refratários ou responsivos ao tratamento medicamentoso. **Métodos:** Foram analisados 26 pacientes com ELTM com boa resposta ao tratamento medicamentoso (grupo “benigno”), 25 refratários e 23 controles por meio do delineamento manual dos limites anatômicos do hipocampo e tálamo, em cortes sequenciais das imagens de RM. O Software DISPLAY foi utilizado. Análise estatística foi realizada com o programa Systat 9. **Resultados:** Houve diferença estatística entre os controles e os grupos benigno e refratário para os volumes do tálamo ipsilateral ao foco epileptogênico ($p=0,00004$). Não houve diferença estatística entre os três grupos para os volumes de tálamo contralateral ao foco epileptogênico. Houve correlação significativa entre hipocampo ipsilateral e tálamo ipsilateral ao foco epileptogênico ($r=0,35$ e $p=0,004$). Quanto maior a idade, menor o volume talâmico ipsilateral ($p=0,002$ e $r=-0,37$). **Conclusão:** Os dados demonstraram que atrofia hipocampal está presente também em pacientes com ELTM e bom controle medicamentoso, sem diferença significativa com a atrofia de pacientes refratários. A atrofia do tálamo foi correlacionada com a idade dos pacientes, o que também pode indicar que outros fatores além da frequência de crises influenciam o grau de lesão nesta estrutura.

Unitermos: epilepsia de lobo temporal; ressonância magnética; volumetria.

ABSTRACT

Comparative analysis of thalamic and hippocampal volume in patients with mesial temporal lobe epilepsy responsive or not to drug therapy

Objective: To investigate the variation of thalamic and hippocampal volume in patients with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) refractory or responsive to drug therapy. **Methods:** We analyzed 26 patients with MTLE responsive to drug therapy, 25 refractory and 23 controls through the manual delineation of anatomic limits of the hippocampus and thalamus, in sequential sections of MR images. The DISPLAY software was used. Statistical analysis was performed using the program Systat 9. **Results:** There were statistically significant differences between controls and patients groups for thalamic volumes ipsilateral to epileptogenic focus ($p=0.00004$). There was no statistical difference between the 3 groups for the volumes of the thalamus contralateral to the epileptogenic focus. There was significant correlation between ipsilateral hippocampus and thalamus ipsilateral to epileptogenic focus ($r=0.35$, $p=0.004$). The older the age, the lower the ipsilateral thalamic volume ($p=0.002$ and $r=-0.37$). **Conclusion:** The data showed that hippocampal atrophy is also present in patients with TLE and good seizure control. The atrophy of thalamus was correlated with the age of patients, which may also indicate that other factors besides the seizure frequency influences the degree of damage of this structure.

Keywords: temporal lobe epilepsy; magnetic resonance imaging; volumetry.

^a Laboratório de Neuroimagem, Departamento de Neurologia, UNICAMP, Campinas, SP.
Received June 05, 2012; accepted June 20, 2012.

INTRODUÇÃO

A epilepsia de lobo temporal mesial (ELMT) apresenta como substrato patológico mais comum a esclerose hipocampal (EH), a qual é constituída por perda neuronal de células piramidais do corno de Ammon e da camada granulada do giro denteado associada à gliose.² A ressonância magnética (RM) permite o diagnóstico de EH baseada em padrões de anormalidades, que incluem atrofia hipocampal (AH) e hipersinal em sequências T2 e podem ser quantificadas através da RM.³ Nas imagens de RM, a AH pode ser unilateral ou bilateral, e mais comumente é assimétrica.⁹

Foi demonstrado, por meio de volumetria manual, que a ELTM pode resultar em atrofia fora do lobo temporal, como, por exemplo, em estruturas como tálamo e núcleo caudado.^{7,12} Através da técnica de Morfometria Baseada em Voxel (Voxel Based Morphometry: VBM), verificou-se diminuição da concentração de massa cinzenta das estruturas conectadas com hipocampo: porção medial do lobo temporal, tálamo, núcleo caudado, cerebelo, giro do cíngulo, lobo parietal e ínsula.¹⁰ A atrofia, em geral, é mais pronunciada nas estruturas que possuem conexões anatômicas e funcionais mais relevantes com o hipocampo.^{1,4,7,11}

Como parte da rede do sistema límbico, o tálamo tem conexões bem desenvolvidas com estruturas do lobo temporal medial.⁸ Em modelos animais de epilepsia, tem sido mostrado que o tálamo tem um papel importante na regulação da excitabilidade cortical e na propagação das crises.¹³ Bonilha determinou através do VBM, que a atrofia talâmica é mais intensa nos núcleos que possuem mais conexões com o hipocampo, ou seja, os núcleos do grupo anterior e dorsolateral do tálamo.⁵ Apesar da redução volumétrica dessas estruturas ser bem reconhecida, os mecanismos que levam a essa alteração ainda não são bem compreendidos. Uma possibilidade é a associação de dano neuronal decorrente das crises epiléticas refratárias.¹¹

Este estudo pretende, através do uso de método de imagem por RM, avaliar e quantificar a diferença entre os volumes de hipocampus e tálamos entre pacientes com ELTM benignos e refratários ao tratamento com drogas antiepiléticas (DAEs).

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo 51 pacientes com diagnóstico clínico e eletroencefalográfico de ELTM seguidos no Serviço de Epilepsia da Universidade de Campinas. O diagnóstico de ELTM foi feito por critérios clínicos e eletroencefalográficos definidos pela ILAE.⁶ Consideramos controle adequado de crises (grupo benigno –

ELTMb) a ocorrência de no máximo três crises parciais ao ano, ou até uma crise generalizada ao ano relacionada à interrupção ou mudança de dose da droga antiepilética (DAE). Os indivíduos que não preencheram estes critérios foram classificados como refratários (ELTMr). O foco epileptogênico foi determinado através dos dados clínicos e registros eletroencefalográficos ictais e interictais.

A análise do volume hipocampal e talâmico foi realizada por delineamento manual dos limites anatômicos das estruturas, em cortes sequenciais das imagens de RM, utilizando o software DISPLAY (*Brain Imaging Center, Montreal Neurological Institute, Canadá*). Este programa permite a visualização simultânea das imagens de RM nos planos coronal, sagital e axial. O volume das estruturas delimitadas é calculado automaticamente pelo software. A fim de determinação da variação normal de cada estrutura, um grupo controle composto por 23 indivíduos sadios também foi submetido à volumetria das imagens de RM.

A estatística foi realizada através do programa Systat 9. Todas as variáveis apresentaram distribuição paramétrica. Teste-*t* e Anova foram utilizados para verificar as diferenças entre os volumes em cada grupo e teste de Pearson para avaliar a correlação entre volume e variáveis clínicas.

RESULTADOS

Vinte e seis pacientes foram classificados como ELTMb e 25 como ELTMr. Houve diferença estatística entre os controles e os grupos ELTMb e ELTMr para os volumes do tálamo ipsilateral ao foco epileptogênico (ANOVA, $p=0,00004$; Figura 1-A), porém, o teste *Post-hoc* não mostrou diferença entre os grupos ELTMb e ELTMr ($p>0,05$; Figura 1-A). Não houve diferença estatística entre os 3 grupos para os volumes de tálamo contralateral ao foco epileptogênico (ANOVA, $p=0,498$; Figura 1-B).

A média dos volumes hipocampus ipsi e contralaterais dos pacientes com ELTMr foi menor do que dos pacientes com ELTMb, porém esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa (Teste-*t* de duas mostras; hipocampus ipsilaterais: $p=0,29$; hipocampus contralaterais: $p=0,25$).

Considerando-se todos os pacientes, houve correlação significativa entre a idade e o volume talâmico ipsilateral ao foco epileptogênico (Correlação de Pearson; $p=0,002$ e $r=-0,37$). Houve correlação significativa entre os volumes do hipocampo ipsilateral e tálamo ipsilateral ao foco epileptogênico (Correlação de Pearson, $r=0,35$ e $p=0,004$; Figura 2-A). Não houve correlação entre hipocampo e tálamo contralaterais ao foco epileptogênico ($p>0,05$; gráfico 5; Figura 2-B).

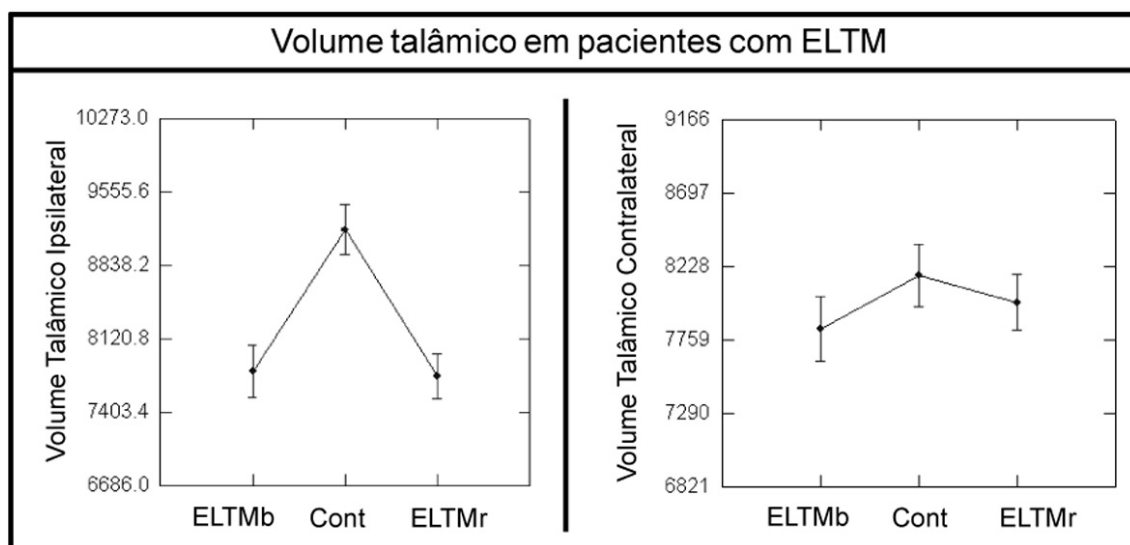


Figura 1. A: Gráfico mostrando diferença significativa entre os controles e os grupos ELTMb e ELTMr para os volumes do tálamo ipsilateral ao foco epileptogênico (ANOVA, $p=0,00004$). Não houve diferença, porém, entre os grupos ELTMb e ELTMr (*Post-hoc*, $p>0,05$). **B:** Não houve diferença estatística entre os 3 grupos para os volumes de tálamo contralateral ao foco epileptogênico (ANOVA, $p=0,498$). ELTMb: epilepsia de lobo temporal benigna; ELTMr: epilepsia de lobo temporal refratária; Cont: controles.

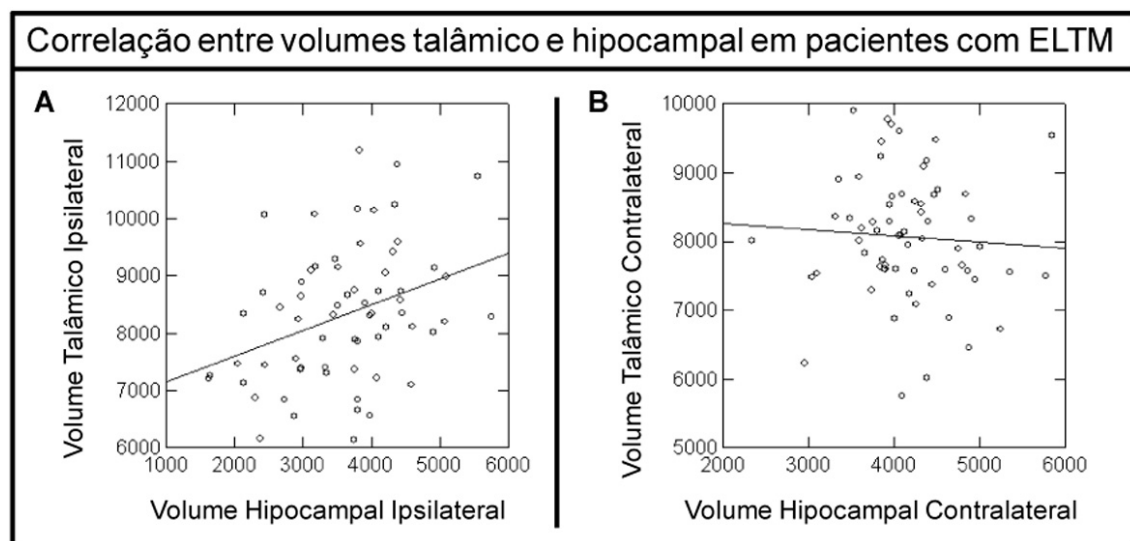


Figura 2. A: Houve correlação significativa entre os volumes do hipocampo e tálamo ipsilaterais ao foco epileptogênico (Correlação de Pearson, $r=0,35$ e $p=0,004$). **B:** Não houve correlação entre hipocampo e tálamo contralaterais ao foco epileptogênico ($p>0,05$).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este estudo pretendia, através do uso de método de imagem por RM, verificar e quantificar a diferença entre os volumes de hipocampus e tálamos entre pacientes com ELTM “benignos” e refratários ao tratamento com DAEs.

A análise dos dados obtidos pela segmentação do hipocampo demonstrou que atrofia hipocampal está presente em pacientes com ELTM e bom controle

medicamentoso (ELT “benigna”) e, portanto, a presença de atrofia de hipocampo não necessariamente indica refratariedade ao tratamento com DAEs. Apesar de ser uma amostra pequena de pacientes, estes resultados sugerem que devem existir outros fatores relacionados à refratariedade na ELTM além do grau de atrofia hipocampal.

O volume do tálamo ipsilateral ao foco epileptogênico em pacientes com ELT benigna e ELT refratária foi semelhante, entretanto, significativamente menor que

nos controles. Diferentemente, a estrutura talâmica contralateral ao foco epileptogênico não demonstrou redução significativa de volume em nenhum dos grupos. Isto sugere que a conexão, através do sistema límbico, com estruturas responsáveis pelo foco epileptogênico levam a danos em todo o circuito que tem contato com essas correntes de sinapses desordenadas. Este achado está de acordo com a hipótese de que atrofia é pronunciada nas estruturas que possuem conexões anatômicas e funcionais mais relevantes com o hipocampo/foco epileptogênico.

REFERÊNCIAS

1. Babb TL, Brown WJ. Pathological findings in epilepsy. In: Engel Jr J (ed). *Surgical Treatment of the Epilepsies*. New York: Raven Press; 1987. p. 511-40.
2. Berkovic SF, Andermann F, Olivier A, Ethier R, Melanson D, Robitaille Y, et al. Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*. 1991; 29:175-82.
3. Jackson GD, Connelly A, Duncan JS, Grünewald RA, Gadian DG. Detection of hippocampal pathology in intractable partial epilepsy: Increased sensitivity with quantitative magnetic resonance T2 relaxometry. *Neurology*. 1993;43:1793-9.
4. Dreifuss S, Vingerhoets FJ, Lazeyras F, Andino SG, Spinelli L, Delavelle J et al. Volumetric measurements of subcortical nuclei in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2001;57:1636-41.
5. Natsume J, Bernasconi N, Andermann F, Bernasconi A., MRI volumetry of the thalamus in temporal, extratemporal, and idiopathic generalized epilepsy. *Neurology*. 2003;60:1296-300.
6. Keller SS, Mackay CE, Barrick TR, Wieshmann UC, Howard MA., Roberts N. Voxel based morphometric comparison of hippocampal and extrahippocampal abnormalities in patients with left and right hippocampal atrophy. *NeuroImage*. 2002;16:23-31.
7. Andermann F. Why study mesial temporal atrophy in patients with intractable temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74:1606-7.
8. Bonilha L, Kobayashi E, Cendes F, Li LM, Rorden C. Medial temporal lobe atrophy in patients with refractory lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74:1627-30.
9. Durvenoy HM, Guyot J. *The Human Brain*. New York: Springer-Verlag Wien; 1991.
10. Robert M, Gale K, Gale C. Mediodorsal Thalamus Plays a Critical Role in the Development of Limbic Motor Seizures. *The Journal of Neuroscience*. 1998;21:9002-9.
11. Bonilha L, Rorden C, Castellano G, Cendes F, Li LM. Voxel-based morphometry of the thalamus in patients with refractory medial temporal epilepsy. *NeuroImage*. 2005;25:1016-21.
12. Mathern GW, Adelson PD, Cahan LD, Leite JP. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res* 2002;135:237-51.
13. Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 1989; 30(4): 389-99.

Endereço para correspondência:

Ana Carolina Coan
Departamento de Neurologia, Faculdade de Ciências Médicas
Universidade de Campinas – UNICAMP
Cidade Universitária
CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Tel: (+55-19) 3521-8242
E-mail: <accoan@gmail.com>

Indução Prévia de LTP na Via CA1-Córtex Pré-Frontal Medial de Ratos Bloqueia os Prejuízos de Plasticidade Pré-Sináptica Induzidos por Modelo de Psicose Pós-Ictal *in vivo**

Lopes-Aguiar C^a, Rossignoli MT^a, Esteves IM^a, Ruggiero RN^a, Bueno Júnior LS^a, Romcy-Pereira RN^b, Leite JP^a

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi testar se a indução de potenciação de longa duração (LTP) no córtex frontal seria capaz de bloquear os efeitos depressores sobre a plasticidade pré-sináptica da via hipocampo (CA1)-córtex pré-frontal medial (mPFC) induzidos por pós-descarga no hipocampo (AD; atividade epilética) ou pela injeção sistêmica de cetamina (KET; modelo farmacológico de psicose). Ratos anestesiados com uretana receberam implantes de eletrodos de estimulação e registro, em CA1 e mPFC, respectivamente. Estímulos elétricos monofásicos pareados foram aplicados em CA1 a cada 20s para eliciar potenciais pós-sinápticos de campo (P1 e P2) no mPFC. Avaliamos a plasticidade de curta duração através da facilitação por pulso pareado (PPF), definida pela razão entre as amplitudes de P2 e P1. Após 90min de registros de linha de base, grupos independentes de animais receberam aplicação de AD, injeção de KET-S(+) (12,5 mg/kg i.p.) ou injeção de veículo (NaCl 0,15M), e foram registrados por mais 120min. Em outro experimento registramos 30min de linha de base e aplicamos estímulos de alta frequência (HFS) para indução de LTP aos 30 e 60min. Trinta minutos depois, os animais receberam KET, AD ou veículo e tiveram seus potenciais corticais registrados por mais 120 min. Nossos resultados mostram que AD gera significativa redução (-50%) da eficiência de transmissão basal na via CA1-mPFC, enquanto KET promove leve aumento (+10%). Ambos os tratamentos também promovem prejuízo significativo da PPF na mesma via (-15%). Além disso, observamos que a indução prévia de LTP atenua as alterações da eficiência basal e bloqueia os prejuízos da PPF na via CA1-mPFC induzidos por KET e AD. Nossos achados reforçam evidências recentes de que moduladores alostéricos positivos de NMDA e AMPA atenuam os prejuízos cognitivos em modelos animais de psicose. Acreditamos, portanto, que a aplicação prévia de HFS na região CA1 do hipocampo pode ser uma ferramenta útil para melhor entendermos como prevenir os prejuízos de plasticidade sináptica no mPFC em modelos de psicose e psicose pós-ictal.

Unitermos: psicose pós-ictal, plasticidade sináptica, via CA1-córtex pré-frontal medial, potenciação de longa duração, pós-descarga, cetamina.

ABSTRACT

Prevention of the CA1-mPFC pre-synaptic plasticity impairments in a post-ictal psychosis model 'in vivo'

The present work aimed to test whether the induction of cortical long-term potentiation (LTP) was able to prevent the presynaptic plasticity impairment in the hippocampus (CA1)-medial prefrontal cortex (mPFC) pathway induced by hippocampal after-discharge (AD; epileptic activity) or systemic injection of ketamine (KET; pharmacological model of psychosis). Electrodes were stereotaxically positioned into CA1 and mPFC in urethane-anesthetized rats. Monophasic paired-pulses of electrical stimuli were applied to CA1 in order to evoke field post-synaptic potentials (P1 and P2) in the mPFC every 20s. Short-term plasticity was evaluated by measuring paired-pulse facilitation (PPF), defined as the amplitude ratio P2/P1. After 90min of baseline

*Trabalho vencedor do Prêmio Aristides Leão – XXXIV Congresso Brasileiro de Epilepsia, 06-09 de junho de 2012, Ribeirão Preto, SP.

^a Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, SP.

^b Instituto do Cérebro, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal-RN.

Received Apr. 28, 2012; accepted Apr. 30, 2012.

recordings, three independent groups of animals received hippocampal-AD, KET-S(+) (12.5mg/kg, i.p.) or vehicle (NaCl 0.15M) followed by 120min of evoked response monitoring. In an additional experiment, two applications of high-frequency stimuli (HFS) were given at 30 and 60min after baseline. Thirty minutes after the second HFS, the rats received KET, AD or vehicle and their cortical evoked potentials were monitored for further 120min. Our results showed that AD significantly decreased (-50%) whereas KET enhanced (+10%) CA1-mPFC basal synaptic transmission. In addition, AD and KET similarly impaired short-term plasticity in the mPFC (-15%). Interestingly, pre-induction of LTP in the mPFC prevented the PPF disruption induced by KET and AD. Altogether, our findings support recent evidences that positive allosteric modulators of NMDA and AMPA receptors attenuate cognitive impairments in animal models of psychosis. We believe that controlled HFS in CA1 can be a useful tool to better understand how to prevent synaptic plasticity disruptions observed in experimental models of psychosis and pos-ictal psychosis.

Keywords: post-ictal psychosis, synaptic plasticity, CA1-medial prefrontal cortex pathway, long-term potentiation, afterdischarge, ketamine.

INTRODUÇÃO

Vários estudos têm mostrado que a incidência de psicose – perturbação que envolve o início súbito de delírios, alucinações, discurso desorganizado ou comportamento amplamente desorganizado ou catatônico – chega a ser três vezes maior em pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) do que em casos de epilepsia generalizada^{1,2}. Entretanto, os mecanismos neurais responsáveis pela ocorrência e fenomenologia dos episódios psicóticos em pacientes com epilepsia ainda são pouco compreendidos.

A relação entre psicose e epilepsia tem sido investigada experimentalmente por meio, principalmente, de (1) protocolos de avaliação comportamental em modelos animais de epilepsia (genéticos ou induzidos)^{3,4,5} e de abrasamento límbico (*kindling* do hipocampo e amígdala)^{6,7,8}; (2) protocolos de evocação de pós-descargas (AD) no hipocampo⁹; e (3) tratamentos agudos ou crônicos com antagonistas não competitivos do receptor de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA)¹⁰.

O modelo de AD única no hipocampo é considerado uma importante ferramenta, pois induz hiperlocomção e movimentos estereotipados, logo que a atividade epileptiforme cessa, reproduzindo alguns aspectos característicos de um episódio psicótico pós-ictal¹¹. Além disso, o prejuízo nas funções do filtro sensorio-motor gerado por indução de AD apresenta-se associado a aumento de oscilações gama (30-100Hz) no hipocampo e córtex pré-frontal medial (mPFC), como observado no modelo de psicose induzido por cetamina (KET)¹¹.

Os modelos de psicose gerados pela administração de antagonistas glutamatérgicos como a fenciclidina (PCP), KET ou a dizocilpina (MK-801) são baseados na hipótese de hipofunção glutamatérgica da esquizofrenia¹⁰. Recentemente foi demonstrado que a administração sistêmica de MK-801, além de potencializar oscilações

gama¹², também é capaz de alterar o perfil espectral dentro da faixa de oscilações lentas (0,5-2Hz) no córtex pré-frontal e reduzir a plasticidade sináptica de curta duração na via CA1-mPFC *in vivo*¹³. É interessante notar que ambos os efeitos foram imediatamente revertidos após administração de AMPAcina, um modulador alostérico positivo de receptores AMPA. Ainda em suporte à hipótese glutamatérgica, estudos pré-clínicos com roedores têm mostrado que a inibição de transportadores de glicina (um co-agonista do receptor NMDA) é capaz de (1) reverter a hiperlocomção e o excesso de liberação dopaminérgica, induzidos por PCP¹⁴, (2) potencializar a atividade do mPFC *in vivo*¹⁵ e (3) reverter os prejuízos de memória de trabalho induzidos por KET¹⁶. Uma série de inibidores de alta afinidade para o transportador de glicina têm sido desenvolvidos e também testados, com sucesso, em modelos experimentais de psicose¹⁴, em pacientes com esquizofrenia¹⁷ e em sujeitos sadios submetidos a administração de KET¹⁸. Consistente com esses achados, alguns estudos sugerem que a clozapina, um antipsicótico atípico, funciona pelo menos em parte como um agonista do sítio de glicina presente nos receptores NMDA¹⁴. Portanto, considerando as evidências sobre o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica nas alterações eletrofisiológicas e comportamentais em modelos experimentais de psicose, nosso objetivo foi testar a hipótese de que a potencialização sináptica de longa duração (LTP) cortical é capaz de bloquear os efeitos depressores da injeção sistêmica de KET ou da aplicação de AD hipocampal, sobre a plasticidade pré-sináptica na via hipocampo (CA1)-mPFC *in vivo*.

MÉTODOS

Ratos Wistar adultos machos foram anestesiados com uretana (1,3g/kg, i.p.) para implantação estereotáxica de eletrodos em CA1 e mPFC segundo coordenadas anatômicas de referência¹⁹. No total, três eletrodos foram implantados:

(1) eletrodo monopolar de registro no mPFC; (2) eletrodo bipolar de estímulo na região CA1 do hipocampo posterior dorsal (com desnível entre as pontas de 0,5 mm) e (3) eletrodo monopolar de registro em CA1, localizado 1,5mm anterior ao eletrodo de estímulo. Estímulos monofásicos pareados (0,2ms de duração; intervalo inter-estímulos de 80ms) aplicados em CA1, a cada 20s, foram capazes de eliciar potenciais pós-sinápticos de campo denominados P1 e P2 no mPFC. A facilitação por pulso pareado (PPF) foi definida pela razão entre as amplitudes de P2 e P1, e foi estudada antes e depois da administração de AD-hipocampal, KET-S(+) (12,5 mg/kg i.p.) ou veículo (NaCl 0,15M i.p.).

Em resumo, após 90min de registro de linha de base, três grupos independentes de animais receberam AD-hipocampal, KET-S(+) ou veículo e tiveram seus potenciais monitorados por mais 120min. Para testar os efeitos da LTP sobre a PPF, três novos grupos de animais foram registrados por 30min de linha de base e, em seguida, receberam duas sessões de estímulos em alta frequência (HFS) aos 30 e 60min. Trinta minutos depois, cada grupo recebeu como tratamento AD, KET-S(+) ou veículo e tiveram seus potenciais corticais registrados por mais 120min. A indução de AD-hipocampal foi realizada por um único trem de estímulos em CA1 constituído por 200 pulsos a 20Hz (pulsos monofásicos; 1ms de duração) com duração total de 10 segundos¹¹. A indução de LTP foi realizada por meio da aplicação de HFS, aos 30 e 60min de registro. Cada HFS consistiu de duas séries de 10 trens (50 pulsos a 250Hz; 0,2ms de duração; a cada 10s), separados por 10min²⁰. A corrente de estimulação utilizada em todos os experimentos foi em intensidade capaz de gerar o maior PPF nessa via determinada a partir da curva de calibração¹⁴. Para analisar os potenciais evocados no mPFC consideramos amplitude de P1 e P2 medidas como a distância entre o ponto máximo do primeiro pico positivo e o ponto mínimo do primeiro pico negativo com latência de 16 a 20 ms. Esses valores foram normalizados com relação à linha de base, definida como 100%. Todas as variáveis analisadas apresentaram

distribuição normal e, por isso, utilizamos o teste estatístico ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

RESULTADOS

A Tabela 1 sintetiza os principais efeitos de KET e AD sobre a transmissão e plasticidade pré-sináptica na via CA1-mPFC *in vivo*. Nossos resultados indicam que a injeção sistêmica de KET aumentou significativamente a amplitude do P1 em dois momentos específicos do experimento, de 120 a 130min e 170 a 190min [Interação tratamento-tempo: +10%, Sham-KET vs. Sham-SAL: $F(20, 260)=1,88$, $p<0.05$; ANOVA de duas vias medidas repetidas e teste *post hoc* de Tukey, $p<0,05$] sem afetar de maneira significativa o P2 da via CA1-mPFC *in vivo* ($p>0,05$). Em contrapartida, a indução de AD gera uma queda robusta de ambos, P1 [Tratamento: -50%; Sham-AD vs. Sham-Sham: $F(1, 12)=61,95$, $p<0,001$, ANOVA de duas vias medidas repetidas] e P2 [Tratamento: -60%; $F(1, 12)=95,88$, $p<0,001$] na mesma via. Além de robusto, esse efeito mostrou ser sustentado, mantendo a queda inicial dos potenciais de 50 a 60% por, no mínimo, 2 horas em relação ao grupo controle (teste *post hoc* de Tukey para P1 e P2; $p<0,05$). Embora KET e AD tenham efeitos bastante distintos sobre a eficiência basal da via CA1-mPFC, ambos geram prejuízo sobre sua plasticidade pré-sináptica, medida por PPF [Tratamento: -15%; Sham-KET vs. Sham-SAL: $F(1, 13)=39,34$, $p<0,001$ e -13%; Sham-AD vs. Sham-Sham: PPF, $F(1, 12)=6,31$, $p<0.05$, ANOVA de duas vias para medidas repetidas]. A Tabela 2 mostra as principais comparações referentes ao segundo estudo realizado para testar a hipótese de que a LTP seria capaz de bloquear os prejuízos de AD e KET. Observa-se que a indução prévia de LTP previne a queda dos PPF gerada por KET e AD. Ao contrário do experimento anterior, nenhuma diferença foi observada entre os grupos tratados com LTP+KET, AD ou SAL [Tratamento: $F(2, 20)=0,089$; $p=0,9$; ANOVA de duas vias para medidas repetidas].

Tabela 1. Efeitos de KET e AD sobre a eficiência basal e plasticidade pré-sináptica da via CA1-mPFC. P1: amplitude do primeiro potencial evocado no mPFC após estimulação de CA1. P2: amplitude do segundo potencial evocado. PPF: razão entre as amplitudes de P2 e P1.

Comparação	ANOVA duas vias medidas repetidas	Parâmetros	Varição
Sham-KET vs. Sham-SAL	$F(20, 260)=1,88$; $p<0.05$	P1	10%
Sham-KET vs. Sham-SAL	n.s.	P2	n.s.
Sham-KET vs. Sham-SAL	$F(1, 13)=39,34$; $p<0,001$	PPF	-15%
Sham-AD vs. Sham-Sham	$F(1, 12)=61,95$; $p<0,001$	P1	-50%
Sham-AD vs. Sham-Sham	$F(1, 12)=95,88$; $p<0,001$	P2	-60%
Sham-AD vs. Sham-Sham	$F(1, 12)=6,31$; $p<0,05$	PPF	-13%

Tabela 2. Efeitos indução prévia de LTP sobre os efeitos depressores de plasticidade pré-sináptica induzidos por KET e AD.

Comparação	ANOVA duas vias medidas repetidas	Parâmetros	Varição
LTP-KET vs. LTP-SAL	n.s.	P1	n.s.
LTP-KET vs. LTP-SAL	n.s.	P2	n.s.
LTP-KET vs. LTP-SAL	n.s.	PPF	n.s.
LTP-AD vs. LTP-SAL	n.s.	P1	n.s.
LTP-AD vs. LTP-SAL	n.s.	P2	n.s.
LTP-AD vs. LTP-SAL	n.s.	PPF	n.s.

CONCLUSÕES

A depressão sináptica observada na via CA1-mPFC gerada por AD pode ser considerada uma nova forma de depressão de longa duração (LTD), neste caso induzida por um evento tipo-ictal, particularmente por ter se mostrado robusta (~50%) e sustentada (duração de 120min). Esta atenuação da resposta do córtex pré-frontal subsequente à atividade epileptiforme hipocampal pode ser responsável por falhas no processamento sináptico límbico-cortical pós-ictal e contribuir para alterações comportamentais observadas neste período. Além disso, os efeitos provenientes de uma única AD são importantes para o entendimento de como crises espontâneas isoladas, da ordem de segundos, podem afetar a comunicação entre áreas de controle executivo interligadas ao foco epiléptico. Por outro lado, o fato da KET e da AD promoverem reduções semelhantes na plasticidade pré-sináptica, mesmo com efeitos distintos nos potenciais evocados basais, sugere que esses tratamentos possam ter atuado diferencialmente nos terminais pré e pós-sinápticos, alterando tanto a eficiência sináptica quanto a excitabilidade local da rede. Por fim, os efeitos da LTP sobre a queda do PPF induzido por KET e AD, estão de acordo com evidências recentes mostrando que a ativação de NMDA e AMPA revertem prejuízos cognitivos em modelos animais de psicose. Consideramos, portanto, que a indução prévia de LTP possa ser uma ferramenta útil para melhor investigarmos como prevenir os prejuízos de plasticidade sináptica no mPFC em modelos de psicose e psicose pós-ictal.

Agradecimentos: Os autores agradecem a Sra. Renata Scandiuzzi e o Sr. Renato Meirelles, pelo excelente suporte técnico, aos colegas de laboratório, Ana Clara Brogini, Ludmyla Kandravicius, Raquel do Val da Silva e José Peixoto, pelas valiosas discussões, e às agências financiadoras FAPESP/CInAPCe; FAPESP; CAPES; CNPq e FAEPa pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Gaitatzis A, Carroll K, Majeed A, W Sander J. The epidemiology of the comorbidity of epilepsy in the general population. *Epilepsia*. 2004;45(12):1613-22.
- Tellez-Zenteno JF, Patten SB, Jetté N, Williams J, Wiebe S. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. *Epilepsia*. 2007;48(12):2336-44.
- Gorji A, Scheller D, Speckmann EJ. The lateral spread of epileptiform discharges in rat neocortical slices: effect of focal phencyclidine application. *Pharmacopsychiatry*. 2003; 36(3):113-20
- Jones NC, Martin S, Megatia I, Hakami T, Salzberg MR, Pinault D, Morris MJ, O'Brien TJ, van den Buuse M. A genetic epilepsy rat model displays endophenotypes of psychosis. *Neurobiol Dis*. 2010;39(1):116-25.
- Cifelli P, Grace AA. Pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy in the rat is associated with increased dopamine neuron activity. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2012;15(7):957-64.
- Smith PF, Darlington CL. The development of psychosis in epilepsy: a re-examination of the kindling hypothesis. *Behav Brain Res*. 1996;75(1-2):59-66.
- Howland JG, Hannesson DK, Barnes SJ, Phillips AG. Kindling of basolateral amygdala but not ventral hippocampus or perirhinal cortex disrupts sensorimotor gating in rats. *Behav Brain Res*. 2007;177(1):30-6.
- Koch M, Ebert U. Deficient sensorimotor gating following seizures in amygdala-kindled rats. *Biol Psychiatry*. 1998;44(4):290-7.
- McCracken CB, Roberts DCS. A single evoked afterdischarge produces rapid time-dependent changes in connexin36 protein expression in adult rat dorsal hippocampus. *Neurosci. Lett*. 2006; 405(1-2):84-8.
- Corlett PR, Honey GD, Krystal JH, Fletcher PC. Glutamatergic model psychoses: prediction error, learning, and inference. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(1):294-315.
- Ma J, Leung LS. Schizophrenia-like behavioral changes after partial hippocampal kindling. *Brain Res*. 2004;997(1):111-8.
- Carlén M, Meletis K, Siegle JH, Cardin JA, Futai K, Vierling-Claassen D, Rühlmann C, Jones SR, Deisseroth K, Sheng M, Moore CI, Tsai LH. A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior. *Mol Psychiatry*. 2012;17(5):537-48
- Kiss T, Hoffmann WE, Hajós M. Delta oscillation and short-term plasticity in the rat medial prefrontal cortex: modelling NMDA hypofunction of schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011;14(1):29-42.
- Moghaddam B, Javitt D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(1):4-15.

15. Chen L, Muhlhauser M, Yang CR. Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons *in vitro* and *in vivo*. *J Neurophysiol*. 2003;89(2):691-703.
16. Roberts BM, Shaffer CL, Seymour PA, Schmidt CJ, Williams GV, Castner SA. Glycine transporter inhibition reverses ketamine induced working memory deficits. *Neuroreport*. 2010;21(5):390-4.
17. Alberati D, Moreau J-L, Lengyel J, Hauser N, Mory R, Borroni E, et al. Glycine reuptake inhibitor RG1678: a pharmacologic characterization of an investigational agent for the treatment of schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2012;62(2):1152-61.
18. D'Souza DC, Singh N, Elander J, Carbutto M, Pittman B, de Haes JU, et al. Glycine transporter inhibitor attenuates the psychotomimetic effects of ketamine in healthy males: preliminary evidence. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(4):1036-46.
19. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Sixth Edition: Hard Cover Edition. 6th ed. Academic Press; 2007.
20. Lopes Aguiar C, Romcy-Pereira RN, Escorsim Szawka R, Galvis-Alonso OY, Anselmo-Franci JA, Pereira Leite J. Muscarinic acetylcholine neurotransmission enhances the late-phase of long-term potentiation in the hippocampal-prefrontal cortex pathway of rats *in vivo*: a possible involvement of monoaminergic systems. *Neuroscience*. 2008;153(4):1309-19.

Endereço para correspondência:

Rodrigo Romcy-Pereira
 Instituto do Cérebro, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)
 CEP 59056-450, Natal, RN, Brasil
 Tel.: (+55-84) 8852-1551
 E-mail: <rnrpereira@gmail.com>, <rnrpereira@neuro.ufrn.br>.

A Caracterização do Perfil de Expressão Gênica em Larga Escala em Modelos Genéticos de Epilepsia Fornece Elementos para Entender os Mecanismos Envolvidos na Epileptogênese em Roedores*

Matos AHB^a, Pascoal VDB^a, Nascimento DR^b, Martins S^b, Rocha CS^a, Vasconcellos JF^a, Chamma MT^c, Maurer-Morelli CV^a, Martins AS^{b2}, Valle AC^c, Godard ALB^d, Lopes-Cendes I^a

UNICAMP, USP e UFMG

RESUMO

Objetivo: O objetivo desse trabalho foi caracterizar e comparar o perfil genético de dois modelos de epilepsia em roedores (*Wistar Audiogenic Rat* – WAR e *generalized epilepsy with absence seizures* – GEAS) através da análise da expressão gênica em larga escala. **Métodos:** Para a análise do perfil de expressão gênica foi utilizada a técnica de microarranjos de DNA (*microarray*). **Resultados:** Na linhagem WAR a análise do perfil de expressão mostrou que dentro os genes mais hiperexpressos está o *Neurod1*, envolvido com o desenvolvimento do ducto coclear. Além desse encontramos também diferenças significativas na expressão dos genes *Apbb1*, *Foxg1* e *Scn1A*. Já nos animais GEAS os genes com maior expressão diferencial foram aqueles relacionados com o desenvolvimento do sistema nervoso central, além de genes envolvidos com a via da MAPK, fatores de transcrição, migração neuronal e apoptose. **Conclusão:** Esta análise pode ajudar a esclarecer o mecanismo molecular subjacente que leva a predisposição a crises nesses animais. Até o momento, nossos resultados apontam para a ativação de vias moleculares distintas em ambos os modelos.

Unitermos: Rato Wistar audiogênico, microarranjos, modelos animais.

ABSTRACT

Gene expression profiling in genetic animal models of provide elements to unveil the molecular mechanisms underlying epileptogenesis in rodents

Objective: The objective of this study was to characterize and compare the genetic profile of two rodent models of epilepsy (*Wistar Audiogenic Rat* – WAR and rats with *generalized epilepsy with absence seizures* – GEAS) using gene expression analysis. **Methods:** We used microarray technology for gene expression analysis. **Results:** The analysis of gene expression profiles in WAR showed among genes up-regulated *Neurod1*, involved in the development of the cochlear duct. In addition, we found significant differences in gene expression of *Apbb1*, *Foxg1* and *Scn1A*. GEAS rats had differentially expressed genes related to the development of central nervous system, as well as genes involved in the MAPK pathway, transcription factors, neuronal migration and apoptosis. **Conclusion:** This study may help to clarify the underlying molecular mechanism that leads to the predisposition to seizures in these animals. Our results indicate the activation of distinct molecular pathways in both models.

Keywords: Wistar audiogenic rat, microarray, animal model.

*Trabalho concorrente ao Prêmio Aristides Leão no XXXIV Congresso Brasileiro de Epilepsia – 06-09 de junho de 2012, Ribeirão Preto, SP.

^a Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

^b Departamento de Patologia, Escola de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP, Brasil.

^c Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

^d Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Received Apr. 28, 2012; accepted Apr. 30, 2012.

INTRODUÇÃO

A utilização de modelos experimentais de epilepsia tem contribuído para um melhor entendimento da fisiopatologia das epilepsias seja *in vitro* quanto *in vivo*. Nos modelos genéticos em roedores são geralmente necessários pelo menos dois fatores combinados para a ocorrência de crise. O primeiro seria uma predisposição geneticamente determinada [mutação(ões) em gene(s)] resultando em uma anormalidade em sistemas essenciais para a manutenção do balanço excitação-inibição no sistema nervoso central (ex. anormalidade em neurotransmissores associados com os sistemas colinérgico, catecolaminérgico, serotoninérgico e/ou de aminoácidos). O segundo fator que pode ou não estar envolvido (dependendo da magnitude do efeito genético), também chamado de iniciador, inclui estímulos do meio ambiente tais como: luz intermitente, som, hipertermia, infecções, alterações neuroquímicas endógenas ou um desequilíbrio hormonal (Jobe et al., 1981). Portanto, para o aparecimento de uma crise epilética, em modelos genéticos, é geralmente necessário (mas não obrigatório) uma predisposição inata à crise somada a um ou mais iniciadores exógenos ou endógenos. Dentro desse modelo é possível que um animal nunca venha a sofrer uma crise epilética devido i) a falta de predisposição (genética) ou ii) do(s) estímulo iniciador(es) (Aicardi et al., 1980).

A linhagem WAR (*Wistar Audiogenic Rat*) é susceptível a crises audiogênicas depois de estimulações sonoras de alta intensidade (Garcia-Cairasco e Sabbatini, 1983; Doretto et al., 2003; Mesquita et al., 2005; Gitaí et al., 2010). Após essas estimulações os animais apresentam crises do tipo tônico-clônicas generalizadas, que se caracterizam por episódios de corridas, pulos e quedas atônicas, seguidas de convulsão tônica, convulsões clônicas parciais e generalizadas e espasmos clônicos, tais eventos fazem parte das crises audiogênicas agudas. Após a repetição contínua dos estímulos sonoros, novas áreas do cérebro começam a ser integradas e os animais passam a apresentar crises límbicas (Moraes et al., 2000).

Outro modelo genético, recentemente identificado, que apresenta epilepsia generalizada do tipo ausência com crises espontâneas (*generalized epilepsy with absence seizures*, GEAS) (Valle, em preparação), mostra padrão comportamental e eletroencefalográfico distinto de outros modelos já descritos (Bruno-Neto et al. 1999a,b; Nunes et al. 1999; André et al. 1999). Nesses animais, também não foi identificado até o momento nenhum fator iniciador para as crises.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar e comparar o perfil genético dessas duas linhagens através da análise da expressão gênica em larga escala. Pretendemos com esse estudo identificar vias moleculares envolvidas nos mecanismos de predisposição à epilepsia (epileptogênese) nesses animais.

MÉTODOS

Foi obtido o RNA total de cinco WAR susceptíveis (hipocampo e placa quadrigêmea), e dois WAR resistentes, bem como hipocampo de três ratos GEAS e três Wistar controles. Para análise do perfil de expressão gênica foi utilizado o *Gene Chip® Rat Genome 230 2.0 Array* (Affymetrix™), que contém 31.042 transcritos de modo a cobrir todo o genoma transcrito do rato. Além das lâminas mencionadas, foram usados os kits *One-Cycle Target Labeling and Control* e *Hybridization Wash and Stain* para a obtenção do cDNA, cRNA, marcação, hibridização, detecção e lavagem. A leitura dos chips foi feita através do *Gene Chip Scanner 3000* (Affymetrix™) e o processamento de dados foi feito em ambiente R com pacotes *Affy* e *Rank Prod* do programa Bioconductor. A análise da representação gênica foi realizada através do programa DAVID e a correlação e a interação de vias moleculares foram identificadas com o programa *Ingenuity Pathways Analysis*.

RESULTADOS

O enriquecimento gênico ontológico identificou na linhagem WAR genes envolvidos com o desenvolvimento neuronal, regulação da transmissão sináptica, projeção neuronal e sinalização celular. As vias de sinalização mais ativas foram a de desenvolvimento do ducto coclear (gene *Neurod1* hiperexpresso) e receptor de sinalização GABA (gene *Gabra6* hiperexpresso). Os principais genes com a expressão alterada e possível papel biológico na epileptogênese foram *Apbb1*, *Foxg1* e *Scn1A*.

Nos animais GEAS foram identificados 45 genes expressos diferencialmente, entre eles estão aqueles relacionados com o desenvolvimento do sistema nervoso central, genes envolvidos com a via da MAPK, fatores de transcrição, migração neuronal e apoptose como *Nr3n1*, *Hspb1*, *Fos*, *Twist1* e *Krt18*. As principais categorias do enriquecimento ontológico incluíram genes ligados a sinalização peptídica, região extracelular e processamento e apresentação do antígeno. As vias de sinalização mais ativadas foram as denominadas como doenças do sistema endócrino, doenças gastrointestinais, ciclo celular e desenvolvimento do sistema nervoso, as quais incluem os genes, *Prlr*, *Hspb1*, *Igfb2*, *CD74* e *Fos*.

DISCUSSÃO

Nossos resultados indicam algumas vias moleculares e gene de interesse diferencialmente expressos nos modelos estudados. Entre eles podemos destacar o gene *Foxg1* (Forkhead Box G1) que tem sua expressão aumentada (*foldchange* = 2,8583) vezes na placa quadrigêmea dos animais WAR susceptíveis em comparação com os

controles. Interessantemente, em publicação recente Brunetti-Pierri (2011), relatou que duplicação na região cromossômica onde o homólogo humano desse gene está localizado produz manifestação clínica caracterizada por déficit cognitivo e epilepsia, sendo que em alguns casos o diagnóstico síndrome foi de síndrome de Rett. Outro gene que deve ser discutido é o *Beta2/Neurod1*, que também se encontra com a expressão aumentada em WAR quando comparado com o grupo controle (*foldchange* = 1,8166). Este tem sido envolvido com neurogênese, diferenciação e manutenção neuronal (Cho and Tsai, 2004).

Nos animais GEAS observou-se que o gene *Fos* (FBJ osteosarcoma oncogene) está com a expressão alterada no hipocampo (*foldchange* = -16,035). É digno de nota que Kovács e cols. (2007), trabalhando com a linhagem de ratos Wistar Albino Glaxo/Rijswijk (WAG/Rij), também considerada um modelo genético de epilepsia ausência observou alterações na expressão do gene *Fos*.

CONCLUSÃO

Acreditamos que o tipo de análise global realizada aqui pode ajudar a esclarecer de maneira mais compreensiva o mecanismo molecular subjacente que leva a predisposição a crises nesses animais. Vias identificadas em nosso estudo podem ser subsequentemente estudadas mais profundamente. Além disso, a interação entre os diversos mecanismos moleculares identificados podem fornecer um panorama mais realista da complexidade envolvida na epileptogênese. É interessante notar que nossos resultados apontam claramente para ativação de vias moleculares distintas nos modelos estudados.

REFERÊNCIAS

Aicard J. Course and prognosis of certain childhood epilepsies with predominantly myoclonic seizures. Wada JA, Penry JK e cols. *Advances*

in epileptology. The Xth Epilepsy International Symposim. New York: Raven; 1980. p. 159-63.

André ES et al. Electrophysiological characterization of a new form of spontaneous epilepsy in Wistar rats. *Epilepsia*. 1999;40(Suppl. 2).

Bruno-Neto R et al. Caracterização de uma nova forma de epilepsia espontânea em ratos Wistar. XIV FESBE, anais, 1999.

Bruno-Neto R, André ES, Pellarin L, Hilário FK, Valle AC, Timo-Iaria C. Electrophysiological characterization of a new form of spontaneous epilepsy in Wistar rats. 23rd International Epilepsy Congress, Prague, Czech Republic; 1999.

Doretto MC, Fonseca CG, Lobo RB, Terra VC, Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. Quantitative study of the response to genetic selection of the WistarAudiogenic Rat strain (WAR). *Behav Genet*. 2003;33(1): 33-42.

Garcia-Cairasco N, Sabbatini R. Role of the substantianigra in audiogenic seizures: a neuroethological analysis in the rat. *Braz J Med Biol Res*. 1983;16(2):171-83.

Gitai DL, Martinelli HN, Valente V, Pereira MG, Oliveira JA, Elias CF, Bittencourt JC, Leite JP, Costa-Neto CM, Garcia-Cairasco N, Paçó-Larson ML. Increased expression of GluR2-flip in the hippocampus of the Wistaraudiogenic rat strain after acute and kindled seizures. *Hippocampus*. 2010;20:125-33.

Jobe PC, Brown RD, Dailey JW. Effect of Ro 4-1284 on audiogenic seizure susceptibility and intensity in epilepsy-prone rats. *Life Sci*. 1981; 28(18):2031-8.

Kovács Z et al. Suppression of spike-wave discharge activity and c-fos expression by 2-methyl-4-oxo-3H-quinazoline-3-acetyl piperidine (Q5) in vivo. *Neuroscience Letters*. 2007;423:73-7.

Mesquita F, Aguiar JF, Oliveira JA, Garcia-Cairasco N, Varanda WA. Electrophysiological properties of cultured hippocampal neurons from WistarAudiogenic rats. *Brain Res Bul*. 2005;65:177-83

Moraes MF, Galvis-Alonso OY, Garcia-Cairasco N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Research*. 2000;39:251-9.

Nunes PV, Valle AC, Timo-Iaria, C. Epileptogenic potentials recorded from the cerebellar cortex in rats. In 23th International Epilepsy Congress, Prague, Czech Republic. *Epilepsia*; 1999. v. 40, p. 132.

Endereço para correspondência:

Iscia Lopes Cendes
Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil
E-mail: icendes@unicamp.br

Hippocampal Proteomic Profile in Temporal Lobe Epilepsy*

Persike DS^a, Lima ML^b, Amorim RP^a, Cavalheiro EA^a, Yacubian EMT^a, Centeno RS^a, Carrete Jr H^a, Schenkman S^b, Canzian M^c, Fernandes MJS^a

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

ABSTRACT

In this study we used proteomics approaches to obtain the protein profile of human epileptic hippocampi (N=6) and control hippocampi obtained from autopsy (N=6). We used two-dimensional gel electrophoresis (2-D) coupled to HPLC and Mass spectroscopy (MALDI-TOF) to identify proteins differentially expressed. Nine proteins were differentially expressed comparing the hippocampus of patients with the hippocampus of control. Proteins that were increased in the hippocampus of patients with TLE were: isoform 1 of serum albumin, HSP 70, dihydropyrimidinase-related protein 2, isoform 1 of myelin basic protein, proton ATPase catalytic subunit A, and dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex. The expression of isoform 3 of spectrin alpha chain (fodrin) was down-regulated while the proteins glutathione S-transferase P and the DJ-1 (PARK7) were detected only in the hippocampus of patients with TLE. Taken together, our results provide evidence supporting a direct link between metabolic disturb and oxidative damage related to pathophysiology of TLE. Besides, indicates biomarkers for further investigations as therapies targeted to epilepsy.

Keywords: temporal lobe epilepsy, hippocampus, proteomics, biomarkers.

RESUMO

Perfil proteômico hipocampal em epilepsia do lobo temporal

No presente estudo empregou-se o método de proteômica para obter a expressão diferencial de proteínas em hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) (N=6) comparado a hipocampus controle obtidos por meio de autópsia (N=6). O estudo foi feito por meio de eletroforese bidimensional, acoplada a HPLC e espectroscopia de massa. As proteínas que tiveram expressão aumentada no hipocampo de pacientes com ELT foram: isoforma-1 da soroalbumina, HSP70, diidropirimidinase-2, isoforma-1 da proteína básica da mielina, subunidade catalítica A da próton ATPase, glutatona S-transferase P, proteína DJ-1 (PARK7), e resíduo diidropolilisina do componente acetil-transferase do complexo da piruvato desidrogenase. A expressão da isoforma-3 da cadeia alfa da espectrina (fodrina) foi menor no hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal e as proteínas glutatona S-transferase P e PARK7 foram detectadas somente no tecido epilético. Assim, nossos resultados trazem evidências sobre a direta relação entre distúrbio metabólico e dano oxidativo na patofisiologia da ELT. Além disto, o estudo indica biomarcadores para futuras investigações como alvos terapêuticos para epilepsia.

Palavras-chave: epilepsia do lobo temporal, hipocampo, proteômica, biomarcadores.

*Trabalho concorrente ao Prêmio Aristides Leão no XXXIV Congresso Brasileiro de Epilepsia – 06-09 de junho de 2012, Ribeirão Preto, SP.

^a Departamento de Neurologia e Neurocirurgia – UNIFESP

^b Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – UNIFESP

^c Departamento de Anatomia Patológica, Instituto do Coração – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Incor/FMUSP).

Received Apr. 28, 2012; accepted Apr. 30, 2012.

BACKGROUND AND PURPOSE

Epilepsy is a chronic disorder characterized by repeated seizures resulting from abnormal activation of neurons in the brain. There are some studies analyzing gene expression in epilepsy. However there is a lack of studies evaluating the regulation of the gene expression, in post-transcriptional or post-translational level, and these data are very important to elucidate the identify proteins which are involved in the pathophysiology of epilepsies. We have used proteomic approaches to investigate the expression of soluble proteins in the hippocampi of patients with temporal lobe epilepsy.

MATERIAL AND METHODS

Human tissue

All experiments were performed under approval from the Institutional Ethics Committee of the Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Patients with intractable epilepsy were submitted to standard cortico-amygdalo-hippocampectomy at the Hospital of São Paulo (UNIPETE/SPDM-UNIFESP). Selected patients (N=6) had detailed anamnesis, video-EEG recordings and MRI studies and after these procedures the epileptogenic zone was delineated. Control hippocampi were obtained from brains showing no evidence of pathology on the basis of gross and routine histological examination removed from autopsies made by a pathologist from Dept. Pathology, Incor/FMUSP.

Sample preparation

Hippocampi were mixed with homogenization buffer consisting of 7M urea, 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 10 mM DTT, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 0.2mM Na₂VO₃ and 1mM NaF. After sonication on an ice bath, the suspension was centrifuged at 12000 × g for 40 min at 4°C. The protein content of the supernatant was determined by using the Bradford method.

Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

Five hundred micrograms of protein from each sample were used for 2-DE. 17 cm linear pH 3-10 IPG strips (BioRad Laboratories, Hercules CA, USA) were used for the first dimension. Isoelectric focusing was performed by using a Protean IEF cell (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Focusing was started at 100 V, and after the voltage was gradually increased to 8 kV in a linear mode during 150 min and, finally, 8.000 V was applied until 45 kVh was reached. The equilibrated strips were then placed onto second dimension 12% SDS-PAGE gels. The SDS-PAGE was conducted in a standard Tris-Glycine-SDS buffer in Protean II xi Cell (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) at a constant current setting of 20 mA/gel for

1h, then at 60 mA/gel until the end. Gels were stained by Coomassie method (Candiano et al., 2004).

Image analysis and determination of proteome differences

Stained gels were scanned by a GS-800 calibrated densitometer (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) and PDQuest 2D-gel analysis software (Version 8.0.1, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) was used to match and analyze visualized protein spots among differential gels in order to compare protein content between TLE samples and control (N=6/group). Normalized density values were used for comparisons, and spots exhibiting at least 2 fold increases or decreases were identified by mass spectrometry.

In-gel digestion

Excised protein spots were subjected to in-gel trypsin digestion for 20 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 50 µl of a solution of trifluoroacetic acid (TFA) at 0.1%. The samples were dehydrated in a vacuum centrifuge and resuspended in 0.1% TFA until ready to be applied to LC-ESI-MS/MS analysis.

Nano-LC-ESI-MS/MS analysis

An aliquot (4.5 µl) of digested proteins was inject by analytic column C18, 1.7 µm, BEH 130 RP-UPLC (nanoAcquity UPLC, Waters) coupled with nano-electrospray tandem mass spectrometry on a Q-Tof Ultima API mass spectrometer (MicroMass/Waters). The gradient was 0-50% acetonitrile in 0.1% formic acid over 45 min. Databases searches for peptide identification from LC MS-MS experiments were done with Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science, Boston, MA) using carbamidomethyl-cys as fixed modification, lysine and/or arginine methylation, lysine acetylation, methionine and/or tryptophan oxidation as variable modification and 0.1Da MS and MS/MS fragment tolerances. Proteins were identified by searching a *Homo sapiens* protein database.

STATISTICS

All data were presented as means ±SD and analyzed by Student's *t*-test. Statistical significance was defined as *p*<0.05.

RESULTS

In total, twelve 2-DE gels corresponding to 6 patients and 6 controls were analyzed simultaneously and matched in the same set. We detected approximately 192-269 spots in each gel. The image analysis revealed 215±21 spots in the patients, and 237±32 in the control. When 2-DE patterns

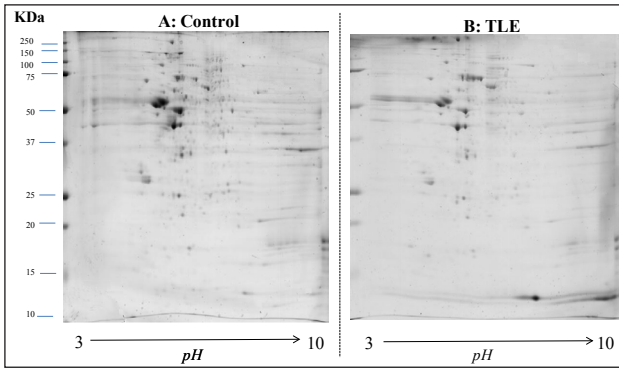


Figure 1. Two-dimensional gel electrophoresis patterns of hippocampus of control (A) and TLE (B) groups (N=6/group).

of the groups were compared 16 spots were differentially expressed between control and epileptic groups.

The Figure 2 describes unique and overlapping proteins with significant difference between the groups. In

the epileptic group 6 spots were up-regulated and 3 were present only in this group. In the control group 2 spots were up-regulated and 5 were found only in this group.

As shown in Table 1, a total of nine distinct proteins were finally identified with ESI-Q-TOF MS and MS/MS analysis. Identified proteins were: isoform 1 of serum albumin, HSP 70, dihydropyrimidinase-related protein 2, isoform 1 of myelin basic protein, isoform 3 of Spectrin alpha chain, proton ATPase catalytic subunit A, glutathione S-transferase P, protein DJ-1 (PARK7), and dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex. The expression of Spectrin was down-regulated in the hippocampi of patients with temporal lobe epilepsy. Glutathione S-transferase P and PARK7 were detected only in epilepsy. All other proteins were up-regulated in epilepsy. Table 2 shows the principal cellular and molecular functions related to the identified proteins.

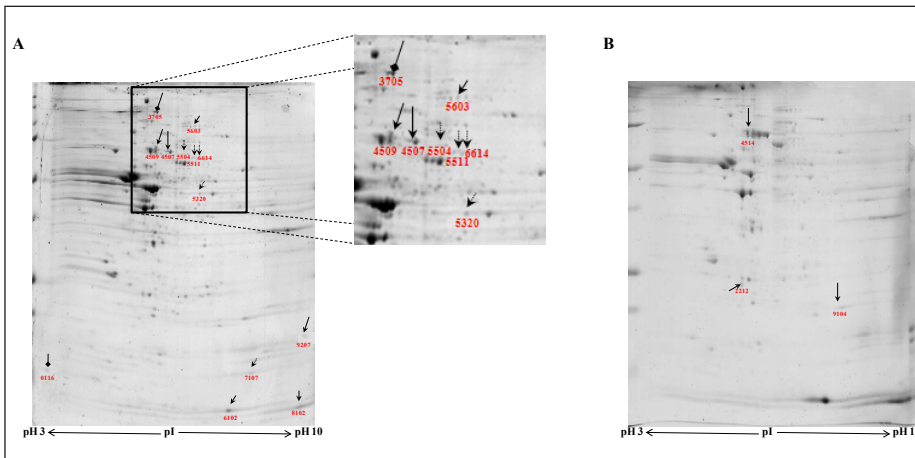


Figure 2. Two-dimensional gel electrophoresis analysis for the validation of protein expression differences between control and TLE groups. In A: up-regulated spots in the TLE are shown as filled arrows (6), marked with dotted arrows are the spots detected only in the control group (5), and marked with arrows with square tip are the spots up-regulated in the control group (2). In B: marked with arrows are the spots detected only in the epileptic group (3). Significance: ≥ 2 fold change, *t*-test, $p < 0.05$.

Table 1. Protein differentially expressed in the hippocampus of patients with TLE.

IP	Protein name	MW	Changes
5.92	Isoform 1 of Serum albumin – ALB	71317	↑
5.56	Heat shock-related 70 kDa protein 2 – HSPA2	70263	↑
8.2	Dihydropyrimidinase-related protein 2 – DPYSL2	77912	↑
9.79	Isoform 1 of Myelin basic protein – MBP	33097	↑
5.21	Isoform 3 of Spectrin alpha chain, brain – SPTAN1	282906	↓
5.35	V-type proton ATPase catalytic subunit A – ATP6V1A	68660	↑
5.43	Glutathione S-transferase P – GSTP1	23569	+
6.33	Protein DJ-1 – PARK7	20050	+
7.96	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial – DLAT	69466	↑

MW: molecular weight; IP: isoelectric point.

All identifications met statistical confidence criteria according to MASCOT and NCBI scoring schemes ($p < 0.05$).

Table 2. Cellular and molecular functions of identified proteins.

Protein name	Function
Isoform 1 of Serum albumin – ALB	Regulation of the colloidal osmotic pressure of blood. Major zinc transporter in plasma.
Heat shock-related 70 kDa protein 2 – HSPA2	Chaperone.
Dihydropyrimidinase-related protein 2 – DPYSL2	Necessary for the remodeling of the cytoskeleton after injury. Plays a role in axon guidance, neuronal growth cone collapse and cell migration.
Isoform 1 of Myelin basic protein – MBP	Structural constituent of myelin sheath. It has a role in both its formation and stabilization. The smaller isoforms might have an important role in remyelination of denuded axons in multiple sclerosis.
Isoform 3 of Spectrin alpha chain, brain – SPTAN1	Interacts with calmodulin in a calcium-dependent manner. Candidate for the calcium-dependent movement of the cytoskeleton at the membrane.
V-type proton ATPase catalytic subunit A – ATP6V1A	Responsible for acidifying a variety of intracellular compartments in eukaryotic cells. It may participate in maintenance of cytoplasmic Ca^{2+} homeostasis.
Glutathione S-transferase P – GSTP1	Conjugation of reduced glutathione to exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles.
Protein DJ-1 – PARK7	Protects cells against oxidative stress and cell death.
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial – DLAT	Catalyzes the overall conversion of pyruvate to acetyl-CoA and CO_2 . It contains multiple copies of three enzymatic components: pyruvate dehydrogenase (E1), dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) and lipoamide dehydrogenase (E3).

The function of each protein was identified using the UniProt database.

CONCLUSIONS

Taken together, our results provide evidence supporting a direct link between metabolic disturb and oxidative damage to the pathology of TLE. Besides, indicates biomarkers for further investigations as therapies targeted at epilepsy. The DPYSL2 a protein that is up-regulated in the hippocampus of epileptic patients with pharmacoresistant seizures has been associated with psychiatric disorder such as schizophrenia. Further studies are needed to elucidate whether this protein represent a link between TLE and psychiatric disorder or is only an independent mechanism. Reduction in fodrin expression is other important data from this study. Fodrin plays an important role in anchoring NMDA receptors in the membrane and disturbances in the expression of this protein may cause changes in the electrophysiological functioning of the receptor.

Financial support: FAPESP, INCT-MCT, CNPq and CAPES. We acknowledge the Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS, Campinas, Brazil for their support with the mass spectrometry analysis.

REFERÊNCIA

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Sabntucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004;25:1327-33.

Correspondence to:

Maria Jose da Silva Fernandes
Rua Pedro de Toledo, 669 – 2º andar
CEP 04039-032, São Paulo, SP, Brasil
E-mail: fernandeseppm@gmail.com

MicroRNA Expression Profile in Epilepsy: Breaking Molecular Barriers*

Danyella B. Dogini^a, Simoni Helena Avansini^a, Fábio Rossi Torres^a, Fabio Rogério^c,
Cristiane S. Rocha^a, Rodrigo Secolin^a, Clarissa L. Yasuda^b, Ana Carolina Coan^b, Ana Flávia Costa^c,
Ana Cláudia Sparapani Piazza^c, Luzia Aparecida Magalhães Ribeiro Reis^c, Luciano de S. Queiroz^c,
Helder Tedeschi^b, Evandro Oliveira^b, Fernando Cendes^b, Iscia Lopes-Cendes^a

Programa CInAPCe** – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

ABSTRACT

Background: MicroRNAs (miRNAs) are small RNA molecules (21-24 nt) that negatively regulate gene expression, either by repression of translation or by degradation of messenger RNA. These molecules are involved in many important processes including cell differentiation, neurogenesis, formation of nervous system and others. Mesial temporal lobe epilepsy and epilepsy caused by cortical dysgenesis are among the leading causes of drug resistant epilepsy. **Objectives:** The objectives of this study were to characterize the expression profile of miRNAs and to investigate their regulation in mesial temporal lobe epilepsy (MTL) and in focal cortical dysplasias (FCDs). **Methods:** Total RNA was extracted from hippocampal and neocortical tissue, maintained in paraffin or fresh-frozen, from patients who underwent surgery for seizure control. For comparison we used tissue obtained from autopsy. RNA was extracted and used in real time PCR reactions (157 miRNAs analyzed) or microarray chips (847 miRNAs analyzed). **Results:** Bioinformatics analyzes identified three miRNAs with expression significantly different in patients with MTLE: let-7d, miR-29b and miR-30d; while in patients with FCDs we found 23 microRNAs differentially expressed. In addition, we found that different pathological forms of had different molecular signatures. **Conclusions:** The possible genes regulated by miRNAs with differential expression in tissue with mesial temporal sclerosis (MTS) are mainly related to neurogenesis and apoptosis. While in DCFs they were predominantly related to cell proliferation and migration. Our results demonstrate the importance of miRNA regulation in molecular processes that lead to the lesions present in the MTS and the FCDs.

Keyword: epilepsy, microRNA, gene expression.

RESUMO

Perfil de expressão microRNAs em epilepsia: revelando novos mecanismos moleculares

Introdução: MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA (21-24 nt) que regulam negativamente a expressão gênica, seja pela repressão da tradução ou pela degradação do RNA mensageiro. Essas moléculas estão envolvidas em muitos processos importantes incluindo diferenciação celular, neurogênese, formação do sistema nervoso entre outras. A epilepsia de lobo temporal mesial e as epilepsias causadas por disgenesias corticais estão entre as principais causas de refratariedade ao tratamento medicamentos nas epilepsias. **Objetivos:** Os objetivos desse trabalho foram elucidar o perfil de expressão dos miRNAs e investigar a regulação dos mesmos na epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM) e nas displasias corticais focais (DCF). **Métodos:** RNA total foi extraído de tecidos de hipocampo e de neocórtex, tanto congelados fresco como em parafina, de pacientes que se submeteram a cirurgia para controle das crises. Para comparação utilizamos tecidos equivalentes provindos de autópsia. Para a análise da expressão dos miRNAs, o RNA extraído foi utilizado em reações de PCR em tempo real (157 miRNAs analisados) ou em chips de microarranjos (847 miRNAs analisados).

* Trabalho concorrente ao Prêmio Aristides Leão no XXXIV Congresso Brasileiro de Epilepsia – 06-09 de junho de 2012, Ribeirão Preto, SP.

** CInAPCe – Cooperação Interinstitucional de Apoio à Pesquisa sobre o Cérebro.

^a Departamento de Genética Médica, FCM-UNICAMP.

^b Departamento de Neurologia, FCM-UNICAMP.

^c Departamento de Anatomia Patológica, FCM-UNICAMP.

Received Apr. 28, 2012; accepted Apr. 30, 2012.

Resultados: Análises de bioinformática identificaram três miRNAs com expressão significativamente alterada em pacientes com ELTM: let-7d, miR-29b e miR-30d; enquanto nos pacientes com DCFs foram encontrados 23 microRNAs diferencialmente expressos, sendo que o padrão de expressão foi diferente em diferentes formas histopatológicas de DCFs. **Conclusões:** Os possíveis genes regulados pelos miRNAs com expressão alterada nos tecidos com esclerose mesial temporal (EMT) estão relacionados principalmente com neurogênese e apoptose. Enquanto que nas DCFs estes estão predominantemente relacionados à proliferação e migração celular. Nossos resultados demonstram a relevância da regulação por miRNAs nos processos moleculares que culminam com a formação das lesões presentes na EMT e nas DCFs. A complexidade dessa regulação começa agora a ser desvendada e pode resultar não só na elucidação dos processos biológicos envolvidos, como também na identificação de biomarcadores de potencial uso clínico nas epilepsias.

Unitermos: epilepsia, microRNA, expressão.

INTRODUÇÃO

A epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM) e as epilepsias causadas pelas malformações corticais, como a displasia cortical focal (DCF) são uma das principais causas de refratariedade das crises ao tratamento medicamentoso. Na ELTM o principal achado histopatológico é a esclerose mesial temporal (EMT) que é caracterizada por perda neuronal e gliose (Wieser, 2004). As DCFs são malformações dentro de um espectro de anormalidades da estrutura laminar do córtex, associadas com características citopatológicas que incluem neurônios gigantes, dismórficos e células em formato de balão (Guerrini, et al., 2008). É grande a proporção de pacientes refratários ao tratamento medicamentoso com drogas antiepilépticas presentes no grupo daqueles com ELTM e com DCFs (Mathern, 2009). Esses pacientes são candidatos ao tratamento cirúrgico que inclui a remoção das áreas lesadas (estruturas mesiais do lobo temporal ou neocórtex). Assim, permanece como desafio nessas duas etiologias de epilepsia refratária, o desenvolvimento de novas terapias para o controle efetivo das crises, sem aumentar o risco de novos déficits neurológicos. Isso envolve conhecer os mecanismos moleculares dessas etiologias e a busca por novos métodos diagnósticos que sejam menos invasivos, mais informativos e eficientes.

Nesse contexto, os microRNAs (miRNAs) têm sido utilizados como biomarcadores tanto para fins de diagnóstico e prognóstico, como para orientar decisões terapêuticas em várias doenças (Hui, 2011). Isso porque essa nova classe de pequenos RNA (21-24nt) não codificadores está envolvida na regulação fina de vários processos biológicos centrais, além de se apresentarem estáveis, reprodutíveis e biodisponíveis na fração plasmática circulante (Huachun, 2011). MiRNAs regulam negativamente a expressão gênica após a transcrição, através da inibição da tradução ou da degradação do RNA mensageiro dos genes alvos (Bartel, 2004). A complexidade da regulação gênica mediada pelos miRNAs pode ser verificada pelo grande número de genes que é alvo dessas moléculas (Lewis et al., 2005). Estudos *in silico* indicam que pelo menos 30% dos genes humanos

sejam alvos dos miRNAs (Bartel, 2004). Os miRNAs estão envolvidos em vários processos biológicos essenciais, tais como diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e formação do sistema nervoso central (Dogini et al., 2008; Vo et al., 2010), além de ser peça chave na regulação pós-transcricional de processos biológicos complexos tais como a neurogênese (Shi et al., 2010).

OBJETIVOS

Caracterizar o perfil de expressão de miRNAs, identificando miRNAs diferencialmente expressos na epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM) e nas displasias corticais focais (DCF). Pretendemos com isso apontar possíveis microRNAs candidatos a biomarcadores na ELTM e nas DCFs.

MATERIAL E MÉTODOS

RNA total foi extraído de quatro amostras de tecido com EMT retirados de pacientes com ELTM refratária ao tratamento clínico. Como tecido controle, foram utilizadas amostras de quatro hipocampus de obtidos por autópsia. Os miRNAs e os genes candidatos foram quantificados por PCR em tempo real com o kit TaqMan™ microRNA assays (Applied Biosystems) e foram quantificadas as expressões de 157 miRNAs. Além disso, RNA total foi extraído com Recover All™ kit (Ambion) de tecidos mantidos em parafina da região do córtex cerebral obtido cirurgicamente para o tratamento de crises refratárias de nove pacientes com DCF (quatro pacientes com DCF tipo IIa e cinco pacientes com tipo DCF IIb). Como controle também foi utilizado tecido cortical de autópsia (n=5). A integridade do RNA das amostras foi avaliada pela Agilent Chip Pico RNA Kit e Bio-Analyzer. A expressão dos miRNAs foi avaliada pela plataforma Affymetrix Gene Chip miRNA Array. Correção de background, sumarização e normalização foram realizadas através do algoritmo RMA. A expressão diferencial dos miRNA foi analisada utilizando o programa RankProd (FDR $p < 0,05$).

RESULTADOS

Após a análise de bioinformática, identificamos três miRNAs com expressão significativamente diferente no tecido de pacientes com ELTM. Estes foram let7d e miR-29b que tiveram sua expressão aumentada nos pacientes e o miR-30d que apresentou expressão diminuída nos pacientes em relação aos controles. Para validação biológica dos genes possivelmente regulados por esses microRNAs, prosseguimos o estudo com a avaliação da expressão desses genes no mesmo tecido. Esses resultados mostraram que o provável gene alvo regulado pelo let7d – NME6 (inibidor de p53) e o alvo para miR-29b – MCL-1 (anti-apoptótico da família do BCL-2), realmente tiveram sua expressão diminuída nas amostras de pacientes em relação ao tecido controle, validando o mecanismo putativo de regulação gênica pelos miRNAs identificados. No entanto, o gene SON, provável alvo do miR30d não apresentou diferença de expressão significativa.

Nos tecidos com DCF, nossas análises identificaram 23 miRNAs diferencialmente expressos quando foram comparados os pacientes e o grupo controle. Além disso, quando o grupo DCF tipo IIa e IIb foram comparados encontramos seis tipos de miRNA diferencialmente expressos entre os dois grupos. Entre eles, observamos uma significativa regulação de vários elementos pertencentes ao *cluster* miR-17~92.

CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo analisando o perfil de expressão de vários miRNAs na ELTM e nas DCFs. Nós identificamos miRNAs com expressão alteradas nos tecidos com EMT (let-7d, miR-30d e miR-29b), os quais regulam vários genes de acordo com análises de bioinformática. Nós validamos experimentalmente genes alvos relacionados aos miRNAs identificados na ELTM: NME6 (alvo do let-7d) e MCL-1 (alvo do miR-29b). NME6 codifica a nucleosídeo difosfato quinase 6, um membro da família de proteínas NM23 que está envolvido com progressão tumoral e metástase bem como com regulação da apoptose (Chow et al., 2006). MCL-1 codifica a proteína de diferenciação celular na leucemia mielóide, que tem também um papel relevante na apoptose através da regulação pelo próprio miR-29b (Zhang et al., 2010).

Já nossos resultados com os tecidos com DCFs mostraram a expressão diferenciada do *cluster* miR-17~92. Este *cluster* é conhecido por contribuir para a regulação da transcrição na diferenciação de células tronco, no envelhecimento (Olive et al., 2010), assim como o ajuste fino de vias envolvidas na diferenciação neuronal. Além disso, identificamos uma assinatura molecular diferente na expressão de miRNAs em subtipos distintos de DCF.

Nossos resultados demonstram a relevância da regulação por miRNAs nos processos moleculares que culminam com a formação das lesões presentes na EMT e nas DCFs. A complexidade dessa regulação começa agora a ser desvendada e pode resultar não só na elucidação dos processos biológicos envolvidos, como também na identificação de biomarcadores de potencial uso clínico nas epilepsias.

Apoio financeiro: FAPESP, CNPq e CInAPCe.

REFERÊNCIAS

- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and functions. *Cell*. 2004;23:281-97.
- Bian S, Sun T. Functions of noncoding RNAs in neural development and neurological diseases. *Mol Neurobiol*. 2011;44:359-73.
- Chow JM, Shen SC, Wu CY, Chen YC. 12-o-Tetradecanoylphorbol 13-acetate prevents baicalein-induced apoptosis via activation of protein kinase C and JNKs in human leukemia cells. *Apoptosis*. 2006 Nov;11(11):1999-2011.
- Dogini DB, Ribeiro PA, Rocha C, Pereira TC, Lopes-Cendes I. MicroRNA expression profile in murine central nervous system development. *J Mol Neurosci*. 2008;35:331-7.
- Guerrini R, Doyns WB, Barkovich AJ. Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. *Trends in Neuroscience*. 2008;31:154-62.
- Huachun Weng, Chunshen Shen, Gou Hirokawa, Xu Ji, Rie Takahashi, Kana Shimada, Chiharu Kishimoto and Naoharu Iwai. Plasma miR-124 as a biomarker for cerebral infarction. *Biomedical Research*. 2011;32:135-41.
- Hui C, How EI, Fei-Fei Liu. Micro-RNAs as diagnostic or prognostic markers in human epithelial malignancies. *BMC Cancer*. 2011;11:500.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120:15-20.
- Mathern GW. Challenges in the surgical treatment of epilepsy patients with cortical dysplasia. *Epilepsia*. 2009;50:45-50.
- Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010;42:1348-1354.
- Shen Q, Temple S. Fine control: microRNA regulation of adult neurogenesis. *Nature Neuroscience*. 2009;12:369-70.
- Shi Y, Zhao X, Hsieh J, Wichterle H, Impey S, Banerjee S, Neveu P, Kosik KS. MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis. *J Neurosci*. 2012;10:30(45):14931-6.
- Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, Impey S. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:16426-31.
- Wieser HG. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 2004;45:695-714.
- Zhang YK, Wang H, Leng Y, Li ZL, Yang YF, Xiao FJ, Li QF, Chen XQ, Wang LS. Biochem. Overexpression of microRNA-29b induces apoptosis of multiple myeloma cells through down regulating Mcl-1. *Biophys Res Commun*. Oct 2011;414(1):233-9.

Endereço para correspondência:

Isclia Lopes Cendes
Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil
E-mail: icendes@unicamp.br

Correlações entre o Genótipo e o Fenótipo na Síndrome de Dravet com Mutações em SCN1A Aumentam a Acurácia do Diagnóstico Molecular*

Gonsales MC^a, Preto P^b, Montenegro MA^b, Guerreiro MM^b, Lopes-Cendes I^a

Programa CInAPCe – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP

RESUMO

Objetivos: O propósito deste estudo foi ampliar o conhecimento acerca da aplicabilidade clínica do teste genético em SCN1A para fenótipos graves do espectro da epilepsia generalizada com crises febris *plus* por meio de triagem de mutações em pacientes com síndromes de Dravet e de Doose e estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo. **Métodos:** A triagem de mutações em SCN1A foi realizada em 15 pacientes com síndrome de Dravet e em 13 com síndrome de Doose. Oito algoritmos de predição foram utilizados para analisar o impacto das mutações na provável função proteica. Além disso, todas as mutações em SCN1A previamente publicadas foram compiladas e analisadas. A técnica de *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA) também foi usada para detectar variações no número de cópias em SCN1A. **Resultados:** Doze mutações foram identificadas em pacientes com síndrome de Dravet, enquanto pacientes com síndrome de Doose não apresentaram mutações. Nossos resultados mostram que mutações *missense* são as mais comuns, e estão localizadas predominantemente nas regiões do poro e porções C- e N-terminal da proteína. Não foram identificadas alterações no número de cópias de SCN1A em nossa casuística. **Conclusões:** O teste genético em SCN1A é de utilidade clínica para pacientes com síndrome de Dravet, mas não para os com síndrome de Doose, pois ambas as síndromes parecem não compartilhar a mesma base genética. Nossos resultados indicam que mutações *missense* podem causar fenótipos graves dependendo da localização e do tipo da substituição do aminoácido. Além disso, a análise de predição utilizando múltiplos algoritmos computacionais foi eficaz para a maioria das mutações. **Unitermos:** teste genético, mutações, canal de sódio.

ABSTRACT

Genotype-Phenotype correlation in Dravet Syndrome with SCN1A mutation increase efficiency of molecular diagnosis

Objectives: The purpose of this study was to advance the knowledge on the clinical use of SCN1A testing for severe epilepsies within the spectrum of generalized epilepsy with febrile seizures *plus* by performing genetic screening in patients with Dravet and Doose syndromes and establishing genotype-phenotype correlations. **Methods:** Mutation screening in SCN1A was performed in 15 patients with Dravet syndrome and 13 with Doose syndrome. Eight prediction algorithms were used to analyze the impact of the mutations in putative protein function. Furthermore, all SCN1A mutations previously published were compiled and analyzed. In addition, *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA) technique was used to detect possible copy number variations within SCN1A. **Results:** Twelve mutations were identified in patients with Dravet syndrome, while patients with Doose syndrome showed no mutations. Our results show that the most common type of mutation found is *missense*, and that they are mostly located in the pore region and the N- and C-terminal of the protein. No copy number variants in SCN1A were identified in our cohort. **Conclusions:** SCN1A testing is clinically useful for patients with Dravet syndrome, but not for those with Doose syndrome, since both syndromes do not seem to share the same genetic basis. Our results indicate that indeed *missense* mutations can cause severe phenotypes depending on its location and the type of amino-acid substitution. Moreover, our strategy for predicting deleterious effect of mutations using multiple computation algorithms was efficient for most of the mutations identified.

Keywords: genetic testing, mutations, sodium channel.

*Trabalho concorrente ao Prêmio Aristides Leão no XXXIV Congresso Brasileiro de Epilepsia – 06-09 de junho de 2012, Ribeirão Preto, SP.

^a Departamento de Genética Médica, FCM-UNICAMP.

^b Departamento de Neurologia, FCM-UNICAMP.

Received Apr. 28, 2012; accepted Apr. 30, 2012.

INTRODUÇÃO

A epilepsia generalizada com crises febris *plus* compreende um espectro clínico de fenótipos que inclui síndromes mais graves como as de Dravet e de Doose¹. Estudos moleculares permitiram a identificação de mutações no gene que codifica a subunidade $\alpha 1$ do canal de sódio voltagem-dependente neuronal (*SCN1A*) em pacientes com fenótipos desse espectro^{2,3}.

O teste genético em *SCN1A* é considerado o de maior aplicabilidade clínica dentre os genes identificados nas diferentes síndromes epiléticas⁴. No entanto, ainda há controvérsias quanto ao uso clínico desse teste molecular e à possível correlação das mutações encontradas e os diferentes fenótipos⁵.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi ampliar o conhecimento acerca da aplicabilidade clínica do teste genético em *SCN1A* para fenótipos graves do espectro de GEFS+ por meio de triagem de mutações em pacientes com síndromes de Dravet e de Doose. Além disso, pretendemos estabelecer correlação genótipo-fenótipo, utilizando múltiplos algoritmos para predição de mutações deletérias e análise comparativa com mutações previamente descritas na literatura, para fins de validação do método computacional de análise escolhido.

MÉTODOS

Pacientes

Foram incluídos neste estudo 15 pacientes diagnosticados com síndrome de Dravet e 13 com síndrome de Doose, todos não aparentados. A caracterização clínica dos pacientes estudados foi realizada de acordo com as diretrizes propostas pela *International League Against Epilepsy* (ILAE), por meio de exames neurológicos, avaliação do histórico de crises, registros eletroencefalográficos (EEG) e neuroimagem. Todos os responsáveis pelos pacientes assinaram o termo de consentimento esclarecido aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Triagem de mutações

O DNA utilizado nas análises moleculares foi obtido a partir de amostras de sangue periférico, utilizando-se o protocolo de extração com fenol-clorofórmio. Os 26 éxons codificantes do gene *SCN1A* foram amplificados por meio da reação da cadeia da polimerase (PCR) e submetidos à triagem pela técnica de *denaturing high-performance liquid chromatography* (DHPLC) ou sequenciados diretamente no aparelho ABI 3500xL. As amostras analisadas por DHPLC que apresentaram perfis cromatográficos alterados foram submetidas ao sequenciador automático no equipamento MegaBACE 1000.

Análises computacionais

Foram utilizados oito algoritmos computacionais para estimar o potencial deletério das alterações que resultam em troca de resíduo de aminoácido na proteína codificada: SIFT⁶, Polyphen 1⁷ and 2⁸, Pmut⁹, MutPred¹⁰, PhD-SNP¹¹, SNAP¹² and SNP&GO¹³. Essas análises levam em consideração as diferenças físico-químicas entre o aminoácido original e o alterado, além da posição da alteração na proteína e o nível de conservação entre sequências homólogas.

Compilação e análise de mutações previamente descritas

Todas as mutações previamente descritas na literatura no gene *SCN1A* para ambos os fenótipos estudados foram compiladas e analisadas quanto a sua provável localização na proteína e submetidas à predição de efeito deletério utilizando os algoritmos descritos acima.

Deteção de variações em número de cópias

Análises por *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA) foram realizadas para detectar variações no número de cópias de segmentos maiores que 1Kb envolvendo o gene *SCN1A*. Foi utilizado o kit SALSA MLPA P137-2, e as amostras foram submetidas a eletroforese capilar nos equipamentos MegaBACE 1000 e ABI 3500xL.

RESULTADOS

A triagem de mutações no gene *SCN1A* revelou doze alterações potencialmente deletérias em nosso estudo, perfazendo 80% dos pacientes com síndrome de Dravet (12/15). Em contraste, nenhuma mutação foi encontrada em pacientes com síndrome de Doose (0/13). Nossos resultados mostraram que seis mutações são do tipo *missense* (50%), três estão em sítios de *splice* (25%), duas são do tipo *frameshift* (17%) e uma é a deleção de um triploto (8%). Segundo a predição de efeito deletério utilizando os oito algoritmos, todas as seis mutações que resultam em troca de aminoácido (c.829T>C, c.971A>C, c.2360T>G, c.4093G>T, c.5178G>T e c.5434T>C) foram consideradas patogênicas. As três alterações localizadas em sítios doadores de *splice* (IVS2+1A>G, IVS4+1G>A e IVS8+3G>T) podem induzir ao processamento aberrante do RNA mensageiro, comprometendo a estrutura e função da proteína. A inserção c.3719_3720insGATA e a deleção c.1242delA promovem alteração na matriz de leitura e geração de um códon prematuro na sequência proteica, o que resultaria em uma proteína truncada, caso seja codificada. Por fim, a deleção c.5489_5491delAGT promove a substituição de dois resíduos de aminoácidos por outro distinto. Não foram identificadas alterações no número de cópias de *SCN1A* em nossa casuística.

A compilação de mutações descritas na literatura em *SCN1A* revelou um total de 518 alterações nucleotídicas e 32 variações de número de cópias nos pacientes com síndrome de Dravet, enquanto apenas duas alterações foram encontradas em pacientes com síndrome de Doose típica. Mutações que alteram resíduo de aminoácido são as mais frequentes em síndrome de Dravet (44%), com predominância nas regiões de formação do poro e nas porções C- e N-terminal da proteína, como também observado em nossa casuística. A análise de predição utilizando múltiplos algoritmos foi eficaz para a maioria das mutações, embora houvesse um menor consenso entre os programas para substituições presentes em segmentos proteicos extramembrana.

DISCUSSÃO

A alta frequência de alterações potencialmente deletérias em *SCN1A* nos pacientes com síndrome de Dravet (80%) indica que o teste genético para fins clínicos é altamente recomendável em indivíduos com esse fenótipo. No entanto, apesar de fazer parte do mesmo espectro clínico, nossos dados sugerem que a síndrome de Doose não compartilha a mesma base genética da síndrome de Dravet. Sendo assim, o teste não seria indicado para pacientes com síndrome de Doose, visto que apenas duas mutações foram identificadas em casos típicos até o momento mesmo depois de compilada toda a literatura mundial sobre o assunto.

Nossos resultados, consistentes com a análise conjuntas das 518 mutações previamente descritas na literatura, mostram uma predominância de mutações *missense*. Estas foram anteriormente consideradas presentes exclusivamente em fenótipos mais brandos¹⁴, o que não é evidenciado pelos dados apresentados no presente trabalho. Essas substituições envolvem aminoácidos conservados evolutivamente e localizados em regiões funcionalmente cruciais da proteína, enquanto as outras alterações estão distribuídas ao longo da mesma. Esse resultado demonstra claramente que mutações *missense* também podem causar fenótipos graves, dependendo das diferenças físico-químicas entre os aminoácidos trocados e da localização da substituição na proteína codificada.

Nossa estratégia de predição de efeito deletério utilizando múltiplos algoritmos mostrou-se eficiente, especialmente para alterações na região proteica transmembrana, que é altamente conservada.

Agradecemos a colaboração dos pacientes e familiares, além das agências de fomento CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Singh R, Andermann E, Whitehouse WP, Harvey AS, Keene DL, Seni MH, Crossland KM, Andermann F, Berkovic SF, Scheffer IE. Severe myoclonic epilepsy of infancy: extended spectrum of GEFS+? *Epilepsia*. 2001;42:837-44.
2. Escayg A, Heils A, Macdonald BT, Haug K, Sander T, Meisler MH. A novel *SCN1A* mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus and prevalence of variants in patients with epilepsy. *Am J Hum Genet*. 2001;68:866-73.
3. Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, Lerman-Sagie T, Lev D, Mazarib A, Brand N, Ben-Zeev B, Goikhman I, Singh R, Kremmidiotis G, Gardner A, Sutherland GR, George Jr AL, Mulley JC, Berkovic SF. Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet*. 2001;68:859-65.
4. Ottman R, Hirose S, Jain S, Lerche H, Lopes-Cendes I, Noebels JL, Serratos J, Zara F, Scheffer IE. Genetic testing in the epilepsies - Report of the ILAE Genetics Commission. *Epilepsia*. 2010;51(4):655-70.
5. Klassen T, Davis C, Goldman A, Burgess D, Chen T, Wheeler D, McPherson J, Bourquin T, Lewis L, Villasana D, Morgan M, Muzny D, Gibbs R, Noebels J. Exome sequencing of ion channel genes reveals complex profiles confounding personal risk assessment in epilepsy. *Cell*. 2011;145:1036-48.
6. <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>
7. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>
8. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
9. <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut>
10. <http://mutpred.mutdb.org>
11. <http://gpcr2.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/PhD-SNP/PhD-SNP.cgi>
12. <http://roslab.org/services/snap>
13. <http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go>
14. Lossin C, Rhodes TH, Desai RR, Vanoye CG, Wang D, Carniciu S, Devinsky O, George Jr AL. Epilepsy-Associated Dysfunction in the Voltage-Gated Neuronal Sodium Channel *SCN1A*. *Journal of Neuroscience*. 2003;23(36):11289-95.

Endereço para correspondência:

Isclia Lopes Cendes
Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil
E-mail: icendes@unicamp.br

Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Children With West Syndrome*

Dias de Sousa MA^a, Bonatti RCF^a, Rodrigues Jr V^b, Azevedo DS^a, Santos MHA^a,
Pereira ROL^a, Leboeiro-Fernandez A^a

Triângulo Mineiro Federal University, Uberaba, MG, Brazil

ABSTRACT

In this study we **aimed** to determine the levels of tumor necrosis factor beta (TNF- β), interleukin (IL) 1-beta (IL-1 β), IL-5, IL-10, and interferon gamma (IFN- γ) in CSF from children during the onset of West syndrome (WS). We observed elevated levels of IL-1 β and IFN- γ correlated to clinical, EEG, therapeutic response, and follow-up suggesting the involvement of immune response in WS. These **results** suggest that inflammatory and immunologic mediators may play a role in the pathophysiologic mechanisms of infantile spasms. Our findings may explain the perfusion and cognitive disfunctions and actions of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticosteroids, and intravenous immunoglobulin (IVIg) observed in WS. In **conclusion**, WS results from association of neurophysiological mechanisms and structural abnormalities with participation of cytokines mainly in symptomatic group.

Keywords: epilepsy, West syndrome, infantile spasms, cytokines.

RESUMO

Citocinas no líquido cefalorraquiano de crianças com síndrome de West

O objetivo do presente trabalho foi quantificar os níveis do fator de necrose tumoral beta (TNF- β), as interleucinas: 1-beta (IL-1 β), cinco (IL-5) e dez (IL-10) e o interferon gama (IFN- γ), no líquido cefalorraquiano (LCR) de crianças durante o período ictal da síndrome de West (WS). Observamos níveis elevados de IL-1 β e IFN- γ associados aos achados clínicos, EEG, resposta terapêutica e evolução, sugerindo o envolvimento do sistema imune na WS. Os resultados indicam que os mediadores imuno-inflamatórios interferem na fisiopatogênese dos espasmos infantis, justificando as disfunções cognitivas e vasculares e a ação do ACTH, corticosteróides e imunoglobulina no tratamento da WS. Em conclusão, a WS forma sintomática resulta da associação de anormalidades estruturais e neurofisiológicas, com a participação de algumas citocinas pró-inflamatórias, principalmente no grupo sintomático.

Unitermos: epilepsia, síndrome de West, espasmo infantil, citocinas.

*Trabalho concorrente ao Prêmio Aristides Leão no XXXIV Congresso Brasileiro de Epilepsia – 06-09 de junho de 2012, Ribeirão Preto, SP.

^a Department of Neurology, Triângulo Mineiro Federal University.

^b Department of Immunology, Triângulo Mineiro Federal University.

Received Apr. 28, 2012; accepted Apr. 30, 2012.

INTRODUCTION

The West syndrome is characterized by infantile spasms, hypsarrhythmia, with or without previously normal psychomotor development. In the symptomatic group multiple etiologies have been described such as focal or diffuse cerebral lesions and anatomical or metabolic disorders or chromosome abnormalities. Cryptogenic group remains with unclear etiology. In both groups, neuropathological and ultrastructural findings are nonspecific, showed none to severe lesions, with or without glial changes secondary to causal etiology.^{1,2,3}

The involvement of the immune system has been described in patients with epilepsies and WS^{4,5,6,7} possibly due to brain lesions⁸ or a common genetically determined susceptibility⁹. Elevated CSF levels of immunoglobulin G was described in WS associated with poor prognosis.¹⁰ On the other hand, the presence of auto-antibodies against brain tissue was not convincingly demonstrated in human epilepsies.⁹

Cytokines are pleiotropic hormones produced by immune competent cells acting as intercellular mediators. They regulate the magnitude and type of effector mechanisms triggered during the host inflammatory reactions and immune response. In this study we aimed to determine the levels of IL-1 β , IL-5, IL-10, TNF- β and IFN- γ in CSF from children during the onset of WS.

SUBJECTS AND METHODS

Patients

We evaluated four infants aged from 4 to 12 months (median 5.5) with a diagnosis of WS. All patients were followed up to the ages 3-4 years. Patients were grouped according with the 1989 Classification. The cryptogenic group included one case without associated etiological factor and the symptomatic group included three patients

with prior signs of brain damage or computed tomography (CT) abnormalities. After the diagnosis, the treatment was started with natural or synthetic ACTH (zinc tetracosactide) 5 IU/kg/day, given intramuscularly.

The CSF specimens were collected for standard procedures, including cell count, and proteins measurement. About 0.5 ml of CSF was stored at -70°C until assayed for IL-1 β , IL-5, IL-10, TNF- β and IFN- γ by ELISA using commercial available monoclonal antibodies pairs. Further CSF samples were obtained 4 to 14 days later from 2 children.

Control samples

Control CSF samples were obtained from ten children (aged 1-12 years; mean 8.2) who were evaluated in the emergency room with suspected involvement of CNS.

RESULTS

Clinical analysis

Neurological examination showed truncal hypotonia, microcephaly, and pathologic reflexes with psychomotor regression before onset of WS in three children (symptomatic group). All of these had diffuse cortical atrophy with ventricular enlargement secondary to perinatal asphyxia. A case of cryptogenic group remained without neuropsychomotor commitment. Routine CSF analysis did not show abnormalities in both groups.

All patients were treated with ACTH for 3 to 15 days (mean 10). Seizure remission occurred within 1 to 5 days (mean 3.2). Relapse of infantile spasms was observed in one case (SGS) from the symptomatic group. Chronic treatment was kept with daily valproate. Follow-up showed neurological abnormalities with severe mental retardation in three and normal educational level in the case of the cryptogenic group. All patients were seizure-free at 3 years follow-up. Persistent EEG findings were observed in one case (BRP).

Table 1. Some clinical findings and concentrations of cytokines in CSF of children with WS.

Patient/ Sex	Age	Seizure type before spasms	Age at spasm onset	Duration of ACTH treatment (days)	Time of spasms cessation (days)	Follow-up with improved seizures	Cytokines (pg/ml)				
							IL-1 β	IL-5	IL-10	TNF- β	IFN- γ
SGS/M	12 mo 19 d	none	4 mo	8	5	3 yr 7 mo	72	0	0	0	0
JWSS/M	6 mo 7 d	Clonic neonatal	6 mo	20	5	3 yr 11 mo	132	0	0	0	185
BRP/F	9 mo 23 d	none	1 mo	5	1	3 yr 10 mo	182	13	0	0	218
RMTF/F	5 mo 29 d	none	6 mo	7	2	3 yr 4 mo	0	0	0	0	0
Mean	8.7 mo		4.3 mo	10	3.2	3 yr 8 mo	102	0	0	0	100

Cytokine levels

Concentrations of IL-1 β , IL-5, IL-10, TNF- β and IFN- γ in CSF and some clinical features are detailed in Table 1. Detected IL-1 β levels were observed in all patients from the symptomatic group on admission; two out of those had concentrations higher than 100 pg/ml. Elevated IFN- γ levels were demonstrated in two children. Cytokines were not detected in CSF from control group.

There was no correlation between cytokines and leukocyte count and protein levels in CSF. Both EEG abnormalities and spasms disappeared more rapidly in the cryptogenic case with no detectable cytokine in CSF. Follow-up of cytokine levels were performed in two patients from the symptomatic group. Both boys became seizure-free within 5 days. The case 1 (SGS) showed normalization of IL-1 β levels in 8 days after hospitalization and for case 2 (JWSS) IL-1 β and IFN- γ levels were still detected after 14 days.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The studies of cytokines in epileptic syndromes unveil important informations about the interface of immune cells and CNS. We have observed that IL-1 β and IFN- γ are present in CSF from patients with WS during acute phase and may explain some pathophysiologic abnormalities described in previous studies.

Production of IL-1 β by peripheral blood mononuclear cells from patients with epilepsy has been described in interictal period¹¹ and at CNS in experimental models during epileptic seizures.¹² Interleukin-1 also increased slow-wave sleep¹³ and may favors appearance of the hypsarrhythmic patterns seen more often in NREM sleep.¹⁴

As our patients did not have pleocytosis in CSF, elevated levels of IL-1 β and IFN- γ may be associated with glial and inflammatory reactions at sites of brain damage². The results of the various parameters showed correlation between IL-1 β and IFN- γ levels in admission and evolution CSF with the presence of CT scan abnormalities.

Some previously normal patients showed mental deterioration and visual-spatial deficits at the onset of the WS possibly associated with hypoperfusion involving the cerebral cortex^{15,16} or secondary to seizure activity.^{17,18} Experimental studies have demonstrated that IL-1 β may cause perfusion disturbances¹³ and block the processes of learning and memory by inhibiting the long-term potentiating in hippocampus even at low concentrations.¹⁹ One patient (cryptogenic group) had normal psychomotor development and undetectable IL-1 β and IFN- γ levels in CSF. These results suggest that cognitive dysfunctions observed in WS may be related to etiology, site of brain dysfunction, seizure activity, and/or

systemic or local production of this cytokine. Cryptogenic group was associated with a good intellectual development.²⁰

Because multifactorial characteristic spasms are resistant to some antiepileptic drugs and non-conventional treatments with variable success, frequent relapses, and severe side effects. ACTH, corticosteroids²¹ and immunoglobulins have been used empirically and their mechanisms of action still remain unknown.^{4,22,23} Otherwise, corticosteroid therapy have inhibitory effects on IL-1 β production and release^{24,25} and IFN- γ synthesis.²⁶ ACTH is the recommend treatment with better results when started early.²⁷ High-dose IVIg has been indicated in most intractable childhood epilepsies particularly after unsuccessful treatment with ACTH.⁴ Commercially available IVIg preparations contain high transforming growth factor- β (TGF- β 1 and TGF- β 2) concentrations which are potent down regulators of cellular immune response.

All our patients showed good response to ACTH with initial spasms remission between 1 to 5 days and one patient showed relapse with further control. Hypsarrhythmic patterns disappeared and normalization of EEG occurred early in the case with undetectable IL-1 β and IFN- γ levels. We believe that ACTH, corticosteroids or "immunoglobulin" cause favorable outcome in some patients with WS not only by probable action as neuroregulators,²⁴ but also by theirs immune regulatory properties. Activation of microglia may be present in others epileptic syndromes like in Landau-Kleffner syndrome,²⁸ whose clinical and neuroradiologic features are suggestive of cortical disfunction and oligodendrocytes involvement.²⁹

Although pathogenesis of WS remains unknown, our results pointed out to the possible role of cytokines, IL-1 β and IFN- γ , in neurophysiological and structural abnormalities mainly in symptomatic group.

REFERENCES

1. Jellinger K. Neuropathological aspects of infantile spasms. *Brain Dev.* 1987;9:349-57.
2. Palm L, Blennow G, Brun A. Infantile spasms and neuronal heterotopias. A report on six cases. *Acta Paediatr Scand.* 1986;75: 855-9.
3. Toga M, Gambarelli, D. Ultrastructural study of three cases of encephalopathy with hypsarrhythmia. Similarities of lesions with subacute spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1982;56:311-4.
4. van Engelen BGM, Renier WO, Weemaes CMR, et al. High-dose intravenous immunoglobulin treatment in cryptogenic West and Lennox-Gastaut syndrome; na add-on study. *Eur J Pediatr.* 1994;153: 762-9.
5. Shiihara T, Miyashita M, Yoshizumi M, Watanabe M, Yamada Y, Kato M. Peripheral lymphocyte subset and serum cytokine profiles of patients with West syndrome. *Brain Dev.* 2010 Oct;32(9):695-702. Epub 2009 Dec 1.

6. Haginoya K, Noguchi R, Zhao Y, Munakata M, Yokoyama H, Tanaka S, Hino-Fukuyo N, Uematsu M, Yamamoto K, Takayanagi M, Iinuma K, Tsuchiya S. Reduced levels of interleukin-1 receptor antagonist in the cerebrospinal fluid in patients with West syndrome. *Epilepsy Res.* 2009 Aug;85(2-3):314-7. Epub 2009 Apr 16.
7. Liu ZS, Wang QW, Wang FL, Yang LZ. Serum cytokine levels are altered in patients with West syndrome. *Brain Dev.* 2001 Nov;23(7):548-51.
8. Andrews JM, Thompson JA, Psyher TJ, Walker ML, Hammond ME. Chronic encephalitis, epilepsy, and cerebrospinal immune complex deposits. *Ann Neurol.* 1990;28: 88-90.
9. Aarli JA. Immunological aspects of epilepsy. *Brain Devl.* 1993;15: 41-50.
10. Benson M, Blennow G, Rosén I. Intrathecal immunoglobulin production and minor motor seizures. *Acta Paediatr Scand.* 1987; 76:147-50.
11. Pacifici R, Paris L, Di Carlo S, et al. Cytokine production in blood mononuclear cells from epileptic patients. *Epilepsia.* 1995;36:384-7.
12. Minami M, Kuraishi Y, Yamaguchi T, et al. Convulsants induce interleukin 1 messenger RNA in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;171:832-7.
13. Dinarello CA. Biology of interleukin 1. *FASEB J.* 1988;2:108-15.
14. Watanabe K, Negoro T, Aso K, Matsumoto A. Reappraisal of interictal electroencephalograms in infantile spasms. *Epilepsia.* 1993;34:679-85.
15. Chiron C, Dulac O, Bulteau C, et al. Study of regional cerebral blood flow in West syndrome. *Epilepsia.* 1993;34:707-15.
16. Jambaqué I, Chiron C, Dulac O, et al. Visual inattention in West syndrome: a neuropsychological and neurofunctional imaging study. *Epilepsia.* 1993;34:692-700.
17. Dam M. Children with epilepsy: the effect of seizures, syndromes, and etiological factors on cognitive functioning. *Epilepsia.* 1990;31 (Suppl. 4):S26-9.
18. Stores G. Electroencephalographic parameters in assessing the cognitive function of children with epilepsy. *Epilepsia.* 1990;31 (Suppl. 4):S45-9.
19. Katsuki H, Nakai S, Hirai Y, et al. Interleukin-1b inhibits long-term potentiation in the CA3 region of mouse hippocampal slices. *Eur J Pharmacol.* 1990;181:323-6.
20. Riikonen R. Long-term outcome of West syndrome: a study of adults with a history of infantile spasms. *Epilepsia* 1996; 37: 367-72.
21. Snead OC. Treatment of infantile spasms with high-dose ACTH: efficacy and plasma levels of ACTH and cortisol. *Neurology* 1989; 39: 1027-31.
22. Appleton RE. Infantile spasms. *Arch Dis Child* 1993; 69:614-8.
23. Riikonen R. Current knowledge of actions of ACTH and corticosteroids. *Brain Dev* 1987; 9: 409-14.
24. Mustafa MM, Lebel MH, Ramilo O, et al. Correlation of interleukin-1b and cachectin concentrations in cerebrospinal fluid and outcome from bacterial meningitis. *J. Pediatr* 1989; 115: 208-13.
25. Quagliarello V, Scheld WM. Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* 1992; 327: 864-72.
26. DeKruyff RH, Fang Y, Umetsu DT. Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *J Immunol.* 1998;160: 2231-7.
27. Lombroso, CT. A prospective study of infantile spasms: clinical and correlations. *Epilepsia.* 1983;24:135-58.
28. Perniola T, Margari L, Buttiglione M, et al. A case of Landau-Kleffner syndrome secondary to inflammatory demyelinating disease. *Epilepsia.* 1993;39:551-6.
29. Zajicek JP, Wing M, Scolding NJ, Compston DAS. Interactions between oligodendrocytes and microglia. *Brain.* 1992;115:1611-31.

Author for correspondence:

Alfredo Leboreiro-Fernandez
 Departments of Neurology and Immunology
 Triângulo Mineiro Federal University
 Av. Getúlio Guaritá, s/nº
 38025-180, Uberaba, MG, Brazil
 E-mail: <leboreiro@mednet.com.br>

Diferenças Metabólicas no Hipocampo Contralateral entre Pacientes Concordantes e Discordantes na Esclerose Mesial Temporal (EMT): Avaliação com Espectroscopia de Protóns por Ressonância Magnética (1H-ERM)*

Nascimento SC^a, Park EJ^a, Lyra KP^a, Valério RM^b, Jorge CL^b, Passarelli V^b, Castro-Lima H^b, Leite CC^a, Castro LHM^b, Otaduy MCG^a

Universidade de São Paulo (USP)

RESUMO

Objetivo: Pacientes com esclerose mesial temporal (EMT) são clinicamente classificados como concordantes ou discordantes de acordo com a extensão da atividade epileptogênica. O objetivo desse estudo é verificar se as alterações metabólicas no hipocampo são diferentes nos dois grupos. **Materiais e métodos:** Foram avaliados 33 pacientes diagnosticados com EMT, 23 concordantes (33 ± 9 anos) e 10 discordantes (33 ± 10 anos), e 28 controles (33 ± 10 anos). Foi obtida espectroscopia por ressonância magnética de ambos os hipocampus (ipsi e contralateral) com aparelho de 3T e com a sequência PRESS de voxel único com TE/TR=135/1500ms. Os principais metabólitos foram quantificados com o LCModel. Para a comparação entre os grupos foram realizados testes estatísticos com nível de significância de 0,05. **Resultados:** Para todos os pacientes foi observada redução de NAA_{ipsi} e Cr_{ipsi} quando comparado com o lado contralateral, porém esta diferença foi significativa apenas para o grupo de pacientes concordantes. Quando comparado com o grupo controles houve uma redução significativa de Cr_{ipsi} e NAA_{ipsi} para os dois grupos e da relação NAA/Cr_{ipsi} para o grupo de pacientes concordantes enquanto que a relação NAA/Cr_{contra} estava diminuída apenas no grupo de pacientes discordantes. **Conclusão:** Nossos achados sugerem uma maior diminuição do NAA/Cr_{ipsi} no grupo de pacientes concordantes e da relação NAA/Cr_{contra} no grupo de pacientes discordantes apontando para um padrão diferente de alteração metabólica para os dois grupos. Porém é preciso aumentar o tamanho da amostra para confirmar estes resultados.

Unitermos: ressonância magnética (RM), espectroscopia por ressonância magnética (ERM), esclerose mesial temporal (EMT), concordante, discordante.

ABSTRACT

Metabolic differences in the contralateral hippocampus of concordant and discordant mesial temporal sclerosis (MTS) patients: evaluation with proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS)

Purpose: Patients with mesial temporal sclerosis (MTS) are clinically classified as concordant or discordant according to the extent of epileptogenic activity. The aim of this study is to determine whether the metabolic changes in the hippocampus are different in the two groups. **Materials and Methods:** 33 patients diagnosed with MTS, 23 concordant (33 ± 9 years old) and 10 discordant (33 ± 10 years old) and 28 controls (33 ± 10 years old) were evaluated. We obtained magnetic resonance spectroscopy of both hippocampi (ipsilateral and contralateral) on a 3T scanner with single voxel PRESS sequence with TE/TR=135/1500ms. The main metabolites were quantified with LC Model. For comparison between groups statistical tests were performed with a significance level of 0.05. **Results:** In all patients a reduction of NAA_{ipsi} and Cr_{ipsi} was observed, when compared to the contralateral side, but this difference was only significant for the group of concordant patients. In comparison with controls a significant reduction of Cr_{ipsi} and NAA_{ipsi} was observed for both groups and for Naa/Cr_{ipsi} in the group of concordant patients while NAA/Cr_{contra} was reduced only in the group of discordant patients. **Conclusion:** Our findings suggest a stronger decline of NAA/Cr_{ipsi} in the group of concordant patients and of NAA/Cr_{contra} in discordant patients, suggesting a slightly different metabolic pattern for both groups. However, we need to increase the sample size to confirm these findings.

Keywords: magnetic resonance (MR), magnetic resonance spectroscopy (MRS), mesial temporal sclerosis (MTS), concordant, discordant.

*Trabalho concorrente ao Prêmio Aristides Leão no XXXIV Congresso Brasileiro de Epilepsia – 06-09 de junho de 2012, Ribeirão Preto, SP.

^a LIM-44 Laboratório de Investigação Médica em Ressonância Magnética da – FMUSP.

^b Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

Received Apr. 28, 2012; accepted Apr. 30, 2012.

INTRODUÇÃO

A Epilepsia é considerada um distúrbio neurológico mais prevalente atualmente afetando aproximadamente cerca de 2% da população mundial. No Brasil a prevalência da epilepsia é elevada semelhante à de outros países em desenvolvimento, estima-se que 18,6 por 1000 habitantes.¹ A Esclerose Mesial Temporal (EMT) é considerada a forma clínica mais conhecida das epilepsias localizadas, sendo a esclerose hipocampal o substrato patológico mais comum em pacientes com epilepsia do lobo temporal refratária.^{2,3} Em centros especializados, no atendimento a pacientes portadores de epilepsia, cerca de 30% dos pacientes não obtém controle farmacológico das crises. Nesses casos a ressecção cirúrgica do hipocampo e do lobo temporal anterior é a opção terapêutica adicional ao tratamento farmacológico, tendo como objetivo eliminar ou diminuir a frequência das crises, com consequente melhora na qualidade de vida dos pacientes.⁴ Há um consenso geral de que a maioria das epilepsias tem uma etiologia multifatorial envolvendo tanto a predisposição genética quanto influências ambientais. A maioria dos pacientes sofre de crises parciais complexas que tem sido mostrado originar nas estruturas do lobo temporal mesial particularmente na região do hipocampo e da amígdala.⁵

Características de imagem e histológicas da EMT em relação ao hipocampo e a estrutura temporal mesial estão documentadas e têm sido extensamente descritas na literatura, sendo que os achados anatomopatológicos usados como critérios de diagnósticos para Esclerose Mesial Temporal por RM incluem alterações morfológicas e a intensidade do sinal. Observa-se a diminuição do volume do hipocampo e a deformação de sua estrutura interna. Já as alterações de sinal se caracterizam pelo aumento do brilho nas sequências ponderadas em T2, bem evidenciado na sequência FLAIR e a diminuição de sinal nas sequências ponderadas em T1. Na maioria dos casos podemos observar a atrofia na região ipsilateral^{7,8} sendo que a perda neuronal abrange todas as regiões do hipocampo, a presença de perda neuronal em mais de 30% do hipocampo associada à gliose constitui a EMT, que é o correlato estrutural da origem de crises epiléticas no lobo temporal e da atividade elétrica epileptiforme da região medial do lobo temporal. Juntas as EMT e as crises epiléticas provenientes da região medial do lobo temporal definem a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM).⁹⁻¹⁰

A 1H-ERM é uma ferramenta de diagnóstico não invasiva que nos fornece valiosas informações sobre o perfil bioquímico e metabólico do cérebro. Atualmente tem sido amplamente utilizada na avaliação pré-operatória de pacientes com epilepsia refratária, especialmente nos casos de EMT, pois pode detectar sutis mudanças na concentração dos metabólitos estudados que podem ser implicados na geração das crises.¹¹⁻²¹

OBJETIVO

O objetivo desse estudo é verificar se as alterações metabólicas no hipocampo são diferentes para os grupos de pacientes concordantes e discordantes.

MÉTODO

Foram estudados por 1H-ERM um total de 33 pacientes com EMT, candidatos à cirurgia de ressecção do hipocampo afetado. Dos pacientes 16 possuem a lesão no hipocampo direito e 17 no hipocampo esquerdo. O grupo de pacientes foi dividido em 2 grupos de acordo com a concordância ou não dos achados de RM com os achados do eletroencefalograma, resultando num grupo de 23 pacientes concordantes (33 ± 9) e 10 pacientes discordantes (33 ± 10), e 28 voluntários (33 ± 10). Os controles não apresentavam queixa neurológica. Os pacientes portadores de EMT encontravam-se sem crises há pelo menos 24 horas.

Os critérios de inclusão foram pacientes com idade superior a 17 anos com epilepsia clinicamente refratária. A EMT unilateral foi observada pela RM convencional e clinicamente comprovada pelo encefalograma (EEG) devido às convulsões de origem temporal. Pacientes incapazes de cooperar nas etapas anteriores ao exame de 1H-ERM e incapazes de realizarem a RM foram excluídos do estudo.

Todos os exames foram realizados no aparelho de ressonância magnética de 3,0T (Intera Achieva, Philips Healthcare, Países Baixos) com bobina de cabeça de 8 canais. As sequências de espectroscopia de voxel único foram realizadas utilizando a sequência PRESS com TR=1500ms, com o TE=135ms, 8 NEX e 128 excitações nos dois hipocampus, com duração aproximada de 4 minutos para cada hipocampo.

O VOI utilizado para a avaliação do hipocampo teve espessura de 1 cm, com a largura de 1,5 cm e 4,0 cm de comprimento, resultando num volume total de 6 cm³. A localização do VOI no hipocampo foi feita a partir de imagem localizadora no plano axial que passa no centro do hipocampo, previamente programada sobre as imagens sagitais.

Todos os pacientes foram diagnosticados com esclerose mesial temporal unilateral pelas imagens de RM convencional, a partir das quais os hipocampus foram classificados em ipsi e contralaterais a lesão.

Foi realizada análise estatística descritiva dos metabólitos e relações metabólicas para cada lado do hipocampo. Foram comparados os valores obtidos para ambos os hipocampus através do teste t, seguido da Análise de Variância (ANOVA) com post hoc de Bonferroni. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0,05$). O programa SPSS (*Statistical Package for the Social Science*, SPSS, Inc., Chicago, IL) para Windows na versão 20 foi usado para fazer todas as análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o propósito de auxiliar a IH-ERM tem sido amplamente utilizada na avaliação do metabolismo cerebral em pacientes com epilepsia e particularmente em pacientes com EMT. Amplamente descrita na literatura e com resultados variáveis a maioria dos estudos nos relatam que os pacientes com EMT sofrem uma diminuição significativa na concentração de NAA e da razão NAA/Cr,¹¹⁻¹⁶ outros apresentaram apenas diminuição na concentração NAA sem alterações de Cr ou NAA/Cr,^{18,19} porém alguns nos mostraram um aumento de Cr no hipocampo ipsilateral.¹¹ A concentração de NAA se encontra significativamente diminuída nos hipocampus ipsilaterais quando comparados com indivíduos controles em todos os estudos.

Em nosso estudo para todos os pacientes foi observada redução de NAA e Cr no hipocampo ipsilateral quando comparado com o contralateral, porém esta diferença foi significativa apenas para o grupo de pacientes concordantes. Essa redução do NAA pode ser interpretada como perda neuronal refletindo no dano do hipocampo ipsilateral e provavelmente pode refletir em danos generalizados no lobo temporal desses pacientes.

Quando comparado com o grupo controle houve uma redução significativa de Cr e NAA para os dois grupos apenas no hipocampo ipsilateral, nossos achados se diferem do estudo de Matthews et al.¹⁷ que nos relatam um aumento global da Cr e Colina sem significância estatística presumindo uma astrocitose. Diferente dos resultados de Thompson et al.¹⁸ o hipocampo contralateral dos pacientes de ambos os grupos do estudo não se apresentou semelhante ao grupo controle. No entanto a relação NAA/Cr_{ipsi} apresentou redução significativa apenas para o grupo de concordantes enquanto que a relação NAA/Cr_{contra} estava diminuída apenas no grupo de pacientes discordantes. Semelhante ao nosso relato, Connelly et al.²⁰ nos apresenta como resultado a redução significativa do NAA/Cr_{contra} dos pacientes em relação ao grupo controle.

Em conclusão nossos achados sugerem uma maior diminuição do NAA_{ipsi} no grupo de pacientes concordantes e da relação NAA/Cr_{contra} no grupo de pacientes discordantes apontando para um padrão diferente de alteração metabólica para os dois grupos.

Apoio financeiro: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CInAPCe (Cooperação Interinstitucional de Apoio a Pesquisas sobre o Cérebro).

REFERÊNCIAS

- Borges MA, Min LL, Guerreiro CA, et al. Urban prevalence of epilepsy: populational study in São Jose do Rio Preto, a medium-sized city in Brasil. *Arq Neuropsiquiatrica*. 2004;62:199-204.
- Babb TI, Brown WJ. Pathological findings in epilepsy. In: Engel Jr J, ed. *Surgical treatment of the epilepsies*. New York: Raven Press; 1987. p. 511-40.
- Bruton CJ. *The neuropathology of temporal lobe epilepsy*. Oxford: Oxford Univ. Press, 1988.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *A Cognição e o Córtex – Fundamentos da neurociência e do Comportamento*. 4ª ed. New York: McGraw-Hill; 2000.
- Hauser, W.A. The natural history of temporal lobe epilepsy. In: H. Lüders (Ed.). *Epilepsy surgery*. New York: Raven Press; 1991. p. 133-41.
- Chang KH, Kim HD, Parque SW, Song IC, Yu IK, Han MH, Lee SK, Chung CK, Parque YH. Usefulness of Single Voxel Proton MR Spectroscopy in the Evaluation of Hippocampal Sclerosis. *Coreano J Radiol*. 2000 Jan./Mar.;1(1):25-32.
- Diegues, M.E. Avaliação de Foco Epileptogênico do Lobo Temporal: Correlação entre Spect ictal, Ressonância Magnética e Ressonância Magnética com Espectroscopia de Prótons. *Radiol. Brasil*. 2007.
- Chiaravallotti DN, Glosser G. Memory For Faces Dissociates From Memory For Location Following Anterior Temporal Lobectomy. *Brain and Cognition*. 2004;54:35-42.
- Mason GF, Behar KL e cols. Aplicações da ressonância magnética para medidas espectroscópicas da neurotransmissão. *Rev Bras Psiquiatria*. 2001.
- Diegues ME. Avaliação de Foco Epileptogênico do Lobo Temporal: Correlação entre Spect ictal, Ressonância Magnética e Ressonância Magnética com Espectroscopia de Prótons. *Radiol. Brasil*. 2007.
- Gadian DG, Connelly A, Duncan JS, et al. 1H magnetic resonance spectroscopy in the investigation of intractable epilepsy. *Acta Neurol Scand*. 1994;152(S):116-21.
- Cendes F, Andermann F, Preul MC, et al. Lateralization of temporal lobe epilepsy based on regional metabolic abnormalities in proton magnetic resonance spectroscopic images. *Ann Neurol*. 1994;35:211-6.
- Garcia PA, Laxer KD, Ng T. Application of spectroscopic imaging in epilepsy. *Magn. Reson Imaging*. 1995;13:1181-5.
- Cross JH, Connelly A, Jackson GD, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy in children with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 1996;39:107-13.
- Hugg JW, Laxer KD, Matson GB, et al. Neuron loss localizes human temporal lobe epilepsy by in vivo proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Ann Neurol*. 1993;34:788-94.
- Epstein C.M., Boor D, Hoffman J.C., et al. Evaluation of 1H magnetic resonance spectroscopic imaging as a diagnostic tool for the lateralization of epileptogenic seizure foci. *Br J Radiol*. 1996; 69:15-24.
- Matthews PM, Andermann F, Arnold DL. A proton magnetic resonance spectroscopy study of focal epilepsy in humans. *Neurology*. 1990;40:985-9.
- Thompson JE, Castillo M, Kwock L, Walters B, Beach R. Usefulness of proton MR spectroscopy in the evaluation of temporal lobe epilepsy. *AJR*. 1998;170:771-6.
- Margerison JH, Corsellis JAN. Epilepsy and the temporal lobes. *Brain*. 1966;89:499-530.
- Connelly A, Jackson GD, Duncan JS, et al. Magnetic resonance spectroscopy in temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 1994;44:1411-7.
- Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Matthews PM, Arnold DL. Normalization of neural metabolic dysfunction after surgery for temporal lobe epilepsy. Evidence from proton MR spectroscopic imaging. *Neurology*. 1997a;49:1525-33.

Endereço para correspondência:

Maria Concepción García Otaduy
Departamento de Ressonância Magnética
InRad-HCFMUSP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 3º andar – Cerqueira César
CEP 05403-900, São Paulo, SP, Brasil
E-mail: <maria.otaduy@hc.fm.usp.br>

Courses, Symposia & Seminars

*Journal of
Epilepsy and
Clinical
Neurophysiology*

J Epilepsy Clin Neurophysiol 2012; 18(2):70

Vai acontecer

- 14 a 17 novembro 2012 – Quito, Ecuador
7th CONGRESO LATINOAMERICANO DE EPILEPSIA – LACE
Local: Quito, Ecuador
Informações: <http://epilepsycongress.org>

- 2013 – LASSE VII – SEIZURES AND EPILEPSIES IN THE TROPICS
Inscrições: estarão abertas a partir de 01 de outubro de 2012
Informações: www.lasse.med.br

JECN **Informações da Secretaria**

Prezado Sócio!

O *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology (JECN)* continua a campanha junto aos seus sócios e colaboradores solicitando a colaboração para o envio artigos originais, de revisão, relatos de casos, cartas e notícias sobre Epilepsia e áreas afins para divulgação.

PARTICIPE!

Enviar para:

Fernando Cendes (Editor)

E-mail: <fcendes@unicamp.br>

The Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology publish voluntary articles or articles requested by the editors on topics related to Epilepsy and Clinical Neurophysiology. All contributions should be submitted the Editorial Council for acceptance. The text can be either in Portuguese, English or Spanish.

Contributions to be considered for publication:

- **Review articles:** should present the main ideas and facts about a specific topic, seeking for controversial findings in the literature and not be just a simple description of it. The author should criticize the methodology and present his/her own interpretation of the data. Should be divided into sections headed Introduction, Objectives, Methods, Results and Conclusion.
- **Original articles:** should present new results of experimental and theoretical research and should be divided into sections headed Introduction, Objectives, Methods, Results and Conclusion.
- **Special articles:** will be published when determined by the editors.
- **Essays:** should present an original interpretation of data and concepts of public domain in order to critically contribute to a particular knowing. Maximum length 500 words.
We do not accept articles previously published in other journals.
- **Letters to the Editor:** should be brief and comment only on material published in the journal. In case of criticism, replying will be allowed. Letters may be reduced.
- **News:** of LBE interest should be sent to the Editorial Council. Maximum length 100 words.
- **Brief communications:** should present brief reports on research results which have reached a stage where they are ready for preliminary communication or case reports of particular relevance.

The J Epilepsy Clin Neurophysiol also accepts information about events, publications of diverse subjects, in any field, which in some way could interest those involved with Epilepsy, epileptic patients or clinical neurophysiology.

Three copies of each article should be sent containing:

- 1 – On the first page: the full title of the paper; the full name of the authors; the department(s) and institution(s) where the work was carried out, the name and the address of the main author correspondence.
- 2 – On the second page: Abstract – of approximately 200 words presenting concisely the objectives, the methodology and conclusion for original articles and the most important findings for review articles and essays. Keywords – a list of 3 to 5 words for indexing purposes should be provided.
- 3 – Further pages: the pages should be numbered consecutively.

Acknowledgements should be included on the last page. References should be identified in the text by arabic numerals in parenthesis, a number for each reference and be listed alphabetically by the last name of the first author.

- 4 – References should be sent separately in accordance to the International Committee of Medical Journal Editors (Ann Intern Med 1997;126:36-47) or at Internet <<http://www.acponline.org>>.
- 5 – Illustration should be sent loosely in a separate envelope. They should not exceed 25% of the space of whole article. Photographs should be in glossy paper in size of 12×8 cm and should indicate on the back with a pencil the title of the article, its sequence and position. Each should have an explanatory caption typed on a separate sheet. Digitalized pictures should have a minimum definition of 600 dpi and be send as a jpeg or tif file. Tables and graphics can be typed and should have their position indicated in the text. Full-collor illustrations and photographs will be charged to the author.
- 6 – The text of the articles should be provided as a Word for Windows, in 12 Times New Roman font, A4 paper size, double-spacing and margins of 3 cm. The lenght of the paper is limited to 8 pages including tables, illustrations, bibliography, etc.
- 7 – Review – papers will be submitted to a stylistics review. Proofs will be sent to authors and should return by fax in 24-48 hours.
- 8 – Authorization – material copied from other sources should be accompanied by a written consent for reproduction. It is the author's responsibility to provide it.
- 9 – Offprints – After september 2008 edition, the JECN won't supply offprints of the articles. Same will be supplied to the authors in PDF file in the journal format final.
- 10 – Eletronic media: All articles published in the paper version of the JECN will also be published in an electronic version, in PDF format, on the Liga Brasileira de Epilepsia website. The home page address for the JECN on the LBE website is <www.epilepsia.org.br/jecn>.



In the electronic version, besides the PDF contents, it is possible to publish videos in digital format. These videos should be in AVI format, using standard Windows codecs (the video must be viewable in any Windows system with no digitalizing card). The maximum allowed duration for each video is 3 minutes, and the recommended size is 240×180 pixels. The videos should be sent in a CD-ROM along with the rest of the material.

Advertising:

Comercial ads are accepted. Please contact the LBE for informations <www.epilepsia.org.br/jecn>.

The articles as the advertisements should be sent to Editor, Dr. Fernando Cendes, Department of Neurology, FCM, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil – E-mail: <fcendes@unicamp.br>.

Contributors and advertisers are responsible for the scientific content and the views expressed. Editorial changes in the format will not be usually communicated.

The J Epilepsy Clin Neurophysiol is indexed in the ISSN nº 1676-2649 and indexed in Latin-American Index Medicus (LILACS), in CNPq (The Brazilian Institute Information), in CCN-IBICT, in Excerpta Medical/Eletronic Publishing Division, Elsevier Science Publishers.

Normas para Publicação

A Revista de Epilepsia e Neurofisiologia Clínica (J Epilepsy Clin Neurophysiol) publica artigos enviados espontaneamente ou por solicitação dos editores e aprovados pelo Conselho Editorial, abordando assuntos relacionados à Epilepsia e Neurofisiologia Clínica.

Serão considerados:

- **Artigos de revisão:** devem reunir os principais fatos e ideias de um determinado tema, buscando achados contróvertidos na literatura, e não somente sua descrição pura e simples. Critique a metodologia e apresente sua própria interpretação das informações. Devem incluir Introdução, Objetivo(s), Métodos, Resultados e Conclusão.
- **Artigos originais:** devem conter resultados novos de pesquisa experimental ou teórica. Devem incluir Introdução, Objetivo(s), Métodos, Resultados e Conclusão.
- **Artigos especiais:** são artigos determinados pelos Editores, escritos por pesquisadores eminentes.
- **Ensaio:** devem conter interpretação original de dados e conceitos de domínio público de forma a contribuir criticamente a um determinado conhecimento. Não devem exceder 500 palavras.
Não aceitamos artigos que já tenham sido previamente publicados em outros periódicos.
- **Cartas:** textos breves e objetivos relativos às publicações do JECN. Nos casos de crítica, será dado o direito de resposta. As cartas poderão ter sua forma abreviada.
- **Notícias:** de interesse da LBE, com até 100 palavras.
- **Comunicações breves:** atualizações sobre relatos de pesquisas em estágio avançado, com resultados próximo de ser divulgados, ou relatos de casos de especial importância.

O J Epilepsy Clin Neurophysiol também aceita informações sobre eventos, publicações ou assuntos diversos, de qualquer área, que de alguma forma, interessem a todos aqueles envolvidos com epilepsia ou com o paciente epilético e com neurofisiologia clínica.

Os artigos devem ser enviados em três vias e conter:

- 1 – Na primeira página: título do artigo, nome completo do autor, instituição onde o trabalho foi realizado e endereço do principal autor para correspondência.
- 2 – Na segunda página: Resumo – com até 200 palavras, estruturado nos itens: objetivos, metodologia, resultados e conclusões (artigos originais). Em artigos de revisão e ensaios devem ser descritos os achados mais importantes. Unitermos – de 3 a 5 palavras que identifiquem o tema apresentado e que sejam úteis para indexação. Procure utilizar termos listados pelos Descritores em Ciência da Saúde (DeCs), editado anualmente pela BIREME/OPAS/OMS, São Paulo.
Abstract – uma versão correta do resumo para a língua inglesa, com unitermos em inglês (keywords).
- 3 – Páginas subsequentes: texto do artigo em páginas numeradas, sendo que na última podem ser incluídos os agradecimentos pertinentes. Citações no texto deverão ser feitas através de números entre parênteses, um número para cada referência, dispostas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor.
- 4 – Referências devem ser enviadas separadas do texto, seguindo normas do Comitê Internacional de Editoras de Revistas Médicas (Ann Intern Med 1997;126:36-47 – BJECN 1997;(3)4:162-173 ou na Internet <<http://www.acponline.org>>.
- 5 – As ilustrações devem ser enviadas em envelopes à parte, sendo que o total das mesmas não deverá exceder a 1/4

do espaço ocupado pelo artigo (no máximo 05 fotos): as fotografias, em papel brilhante e em dimensões de 12×8 cm, devem conter no verso e a lápis, o título do artigo, sua sequência e posição, acompanhadas das respectivas legendas, em folha separada. No caso de fotos digitalizadas, estas devem ter definição mínima de 600 dpi e serem enviadas em arquivo separado do artigo nos formatos jpeg ou tif. Os gráficos e as tabelas poderão ser digitadas e suas posições indicadas no texto. Ilustrações e fotos coloridas serão cobradas dos autores.

- 6 – O texto dos artigos deverá ser digitado no programa Word para Windows, na fonte Times New Roman, corpo 12, papel formato A4, espaço duplo e margens de 3 cm. Máximo de 08 páginas por artigo (incluindo tabelas, ilustrações, bibliografia, etc.). Enviar além das 3 vias impressas, cópias em disquete, CD ou DVD.
- 7 – Revisão dos originais: os artigos serão submetidos à revisão linguística antes da publicação. As provas gráficas serão enviadas ao autor e devem ser devolvidas em 24 horas com as correções pertinentes.
- 8 – Autorização – material copiado de outras fontes deve ser acompanhado por autorização escrita para reprodução, sendo responsabilidade do autor obter tal permissão.
- 9 – Separatas – A partir da edição de setembro de 2008, o JECN não fornecerá separatas dos artigos, os mesmos serão enviados aos autores em arquivo PDF no formato final da revista.
- 10 – Revista eletrônica – Os artigos publicados na versão em papel do JECN serão também publicados em versão eletrônica, no formato PDF, no site da Liga Brasileira de Epilepsia. A home-page do JECN no site da LBE é <www.epilepsia.org.br/jecn>.



Na versão eletrônica, além do conteúdo do PDF, é possível publicar vídeos em formato digital. Esses vídeos deverão estar em formato AVI, utilizando codecs padrão do windows (o vídeo deve poder ser aberto em qualquer computador com windows que não possua placa digitalizadora de vídeo). A duração máxima do vídeo é de 3 minutos e o tamanho recomendado é de 240×180 pixels. Os vídeos deverão ser enviados em CD-ROM juntamente com o restante do material.

Anúncios:

O J Epilepsy Clin Neurophysiol aceita anúncios de natureza comercial. Para informações, entrar em contato com a LBE <www.epilepsia.org.br/jecn>.

Os artigos e/ou anúncios deverão ser enviados ao Editor Executivo, Dr. Fernando Cendes, Departamento de Neurologia, FCM, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil – E-mail: <fcendes@unicamp.br>.

A LBE não se responsabiliza por opiniões ou conceitos emitidos nesta publicação em artigos ou anúncios de responsabilidade especificada. Alterações editoriais de forma não serão comunicadas aos autores.

O J Epilepsy Clin Neurophysiol é catalogado no ISSN sob o nº 1676-2649, indexado no Index Medicus Latino-Americano (LILACS), no Instituto Brasileiro de Informação em Ciências e Tecnologia (CNPq), no Catálogo Coletivo Nacional de Periódicos do IBICT, na Excerpta Medica/Electronic Publishing Division, Elsevier Science Publishers.