

Paula Hespanholo Nascimento

**Padrão de distribuição e localização de expressão
das proteínas VILIP-1, receptor sensor de cálcio e
receptor metabotrópico do glutamato 1 em tecidos de
pacientes com epilepsia do lobo temporal.**

Campinas

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO E LOCALIZAÇÃO
DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS VILIP-1,
RECEPTOR SENSOR DE CÁLCIO E RECEPTOR
METABOTRÓPICO DO GLUTAMATO 1 EM TECIDOS
DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL.

Paula Hespanholo Nascimento

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós -
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Saúde da Criança e do
Adolescente, área de concentração em Saúde da
Criança e do Adolescente sob orientação da Profa.
Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

N17p	<p>Nascimento, Paula Hespanholo, 1984 - Padrão de distribuição e localização de expressão das proteínas VILIP-1, receptor sensor de cálcio e receptor metabotrópico do glutamato 1 em tecidos de pacientes com epilepsia do lobo temporal / Paula Hespanholo Nascimento. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador : Lília Freire Rodrigues de Souza Li. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Imunoistoquímica. 2. Excitotoxicidade. 3. Neurotransmissores. I. Li, Lília Freire Rodrigues de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Pattern of distribution and localization of VILIP-1, Calcium-sensing receptor and metabotropic glutamate receptor in hippocampal tissues from patients with temporal lobe epilepsy.

Palavra-chave em inglês:

Imunohistochemistry

Excitotoxicity

Neurotransmitters

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora:

Lília Freire Rodrigues de Souza Li [Orientador]

Marino Muxfeldt Biachin

Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Data da defesa: 06-03-2012

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Aluna Paula Hespanholo Nascimento

Orientador: Profa. Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li

Membros:

Professora Doutora Lília Freire Rodrigues de Souza Li

Professor Doutor Marino Muxfeldt Bianchin

Professora Doutora Elenice Aparecida de Moraes Ferraz

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas.

Data: 06/03/2012

Dedicatória

Aos meus pais, Antonio Carlos e Natália

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força nos momentos mais difíceis.

Aos Espíritos de Luz que estiveram sempre ao meu lado.

Aos meus pais, Antonio Carlos e Natália, pelo amor incondicional, carinho, apoio moral e psicológico.

Minha irmã, Cláudia, meus avós, meus tios e primos.

Meu namorado, Leandro, por todo amor, carinho, paciência e compreensão.

Profa. Dra. Lilia Li pela oportunidade, orientação e incentivo

Amigos e amigas do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED): Paulo Latuff, Simone Cristina, Milton, Silvana, Tais, Vanessa Ramalho, Vanessa Oya pela ajuda e paciência.

Ao amigo Julio (LAPE).

As amigas Simone e Rose.

Colegas do Laboratório de Endocrinologia Pediátrica: Marcelo, Vinícius, Maria Cristina, Anna Érika

Dr. José Vassalo pela ajuda com as imunoistoquímicas.

Dr. Luciano Souza Queiroz, Cláudia e Luzia (Anatomia Patológica)

Dr. Evandro Pinto da Luz de Oliveira e Dr. Helder Tedeschi por cederem os tecidos

A todos meus colegas e amigos que entenderam minhas ausências.

A FAPESP pela bolsa de estudos.

Sumário

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xi
Lista de Abreviaturas	xi
Abstract	xii
Resumo	xiv
Introdução	16
Epilepsia e Esclerose Hipocampal	16
Receptores que Acoplam a Proteína G	18
Receptores Metabotrópicos de Glutamato	20
Papel de mGluRs do grupo I em epilepsia.....	23
Receptor Sensor de Cálcio	25
VILIP-1	29
Anatomia do hipocampo	31
Objetivos	35
Objetivo Geral	35
Objetivos Específicos	35
Material e Métodos	36
Tecidos	36
Imunoistoquímica	36
1. Processamento histológico.....	36
2. Reação de Imunoistoquímica	37
3. Contagem das células e análise dos resultados	39
PCR em tempo Real	39
Análise estatística	40
Resultados	41
Imunoistoquímica	41
Avaliação quantitativa da expressão de RNA por PCR em tempo real	48
Discussão	51
Conclusão	55
Referências	56
Anexos	63
Anexo I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	63

Lista de Figuras

Figura 1- Característica estrutural de uma GPCR.....	19
Figura 2-Representação esquemática da transdução de sinal de um mGluR1	23
Figura 3- Estrutura de “Venus Flytrap” da proteína CASR	27
Figura 4- Anatomia do hipocampo.....	33
Figura 5- Estrutura do hipocampo.....	34
Figura 6- Histologia de <i>stratum pyramidale</i> de CA1.....	42
Figura 7- Imunoistoquímica de tecido hipocampal de controle (A e B) e paciente com ELT (C e D) marcado com anticorpo anti-VILIP-1 em neurônios piramidais de CA1.....	43
Figura 8- Expressão de VILIP-1 em neurônios piramidais de CA1.....	44
Figura 9- Imunoistoquímica de tecido hipocampal de controle (A e B) e paciente com ELT (C e D) marcado com anticorpo anti-CASR em neurônios piramidais de CA1.....	45
Figura 10- Expressão de CASR em neurônios piramidais de CA1.....	46
Figura 11- Imunoistoquímica de tecido hipocampal de controle (A e B) e paciente com ELT (C e D) marcado com anticorpo anti-mGluR1 em neurônios piramidais de CA1.	47
Figura 12- Expressão de mGluR1 em neurônios piramidais de CA1.	48
Figura 13- Expressão relativa dos RNAs mensageiros de VILIP-1 (A); CASR (B) e mGluR1 (C) e de todos (D) por PCR em tempo real real de tecido hipocampal de controles (C) e Pacientes (P).....	50

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes estudados.....	41
Tabela 2- Porcentagem de Células Marcadas pelo Anticorpo anti-VILIP-1	44
Tabela 3- Porcentagem de neurônios piramidais de CA1 marcados pelo anticorpo anti-CASR.....	46
Tabela 4- Porcentagem de Células Marcadas pelo Anticorpo anti-mGluR1 em controles (C) e pacientes com ELT (P).	48

Lista de Abreviaturas

μL	Microlitro
Mg	Micrograma
Mm	Micrometro
AMP	Monofosfato cíclico de adenosina (<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)
AMPA	<i>2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid</i>
CASR	Receptor sensor de cálcio (<i>Calcium sensing receptor</i>)
CA	<i>Cornu ammonis</i>
cDNA	Acido desoxiribonucléico complementar (<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>)
DAB	<i>3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride</i>
DEPC	Diethylpirocarbonato
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
EH	Esclerose Hipocampal
GABA _A	Ácido gama-aminobutírico
GPCR	<i>G-protein coupled receptors</i>
LTP	Potenciação de longa duração
mGluR	Receptor metabotrópico do glutamato
mRNA	RNA mensageiro
NCS	Sensores de Cálcio Neuronal (<i>Neuronal Calcium Sensors</i>)
NMDA	N-metil D-aspartato
PBS	Tampão fostato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PTH	Hormônio paratireoidiano
RNA	Ácido Ribonucléico (<i>Ribonucleic acid</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
VFT	<i>Venus-flytrap like</i>
VILIP	<i>Visinin like protein</i>

Abstract

Hippocampal sclerosis (HS) is associated to temporal lobe epilepsy (TLE) and cause altered expression of neurotransmitter receptors such as metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1). However, whether its expression level is increased or decreased in temporal lobe epilepsy is still controversial. Calcium-sensing receptor (CASR), another receptor from the same family of mGluR1, is expressed in hippocampus, but its role in brain is unknown. VILIP-1, a neuronal calcium sensing protein (NCS) is expressed predominantly in brain and in humans its expression was identified by immunohistochemistry in subpopulations of pyramidal neurons in CA1 and CA4 in hippocampus. Activation of mGluR1 is suggested that may regulates VILIP-1 expression during hippocampal plasticity. However, there are no studies associating VILIP-1 and hippocampal sclerosis. We hypothesized that not only mGluR1 but also VILIP and CASR is involved in hippocampal sclerosis in TLE patients. The objective of this study was to analyze the pattern of expression of VILIP-1, CASR and mGluR1 in hippocampal tissues from patients with TLE who underwent amygdalohippocampectomy. Our results demonstrated the presence of hippocampal sclerosis in hippocampal tissues in patients with TLE with reduction in the number of neurons in CA1 and gliosis. By the expression analysis of the transcripts of VILIP-1, CASR and mGluR1 in total hippocampus using real time PCR, we did not find differences on mRNAs expression of patients compared with controls. However, when we compared the protein expression from hippocampi from patients with controls, by immunohistochemistry, we not only found an important reduction on neuron cell number in patients, but also an important reduction on positively stained neurons for VILIP-1, CASR

and mGluR1, suggesting that not only mGluR1, but also CASR and VILIP1 are associated to HS in patients with TLE.

Resumo

A esclerose hipocampal está associada à epilepsia de lobo temporal medial (ELT) e causa expressão alterada de receptores tais como o Receptor Metabotrópico de Glutamato (mGluR1). Contudo, ainda há controvérsias se sua expressão está aumentada ou diminuída em ELT. O Receptor Sensor de Cálcio (CASR), outro receptor da mesma família do mGluR1, é expresso em hipocampo, mas seu papel no cérebro ainda é desconhecido. VILIP-1 é uma proteína sensora de cálcio neuronal (NCS) expressa predominantemente no cérebro e em humanos e sua expressão foi mapeada por imunistoquímica na subpopulação de neurônios piramidais em CA1 e CA4 de hipocampo. Sugere-se também que a ativação de mGluR possa regular a expressão de VILIP-1 durante a plasticidade hipocampal. No entanto, não há estudos associando VILIP-1 e esclerose hipocampal. Nós hipotetizamos que além do mGluR1, o CASR e o VILIP-1 estão associados a esclerose hipocampal em ELT. O objetivo deste trabalho foi analisar o padrão de expressão de VILIP-1, CASR e mGluR1, em hipocampo de pacientes com ELT submetidos a amigdalohipocampectomia. Nossos resultados demonstraram a presença de EH nos tecidos hipocampais de pacientes com ELT com redução no número de neurônios em CA1 e presença de intensa gliose. Pela análise da expressão dos transcritos *VILIP-1*, *CASR* e *mGluR1* em hipocampo total utilizando PCR em tempo real não encontramos diferença na expressão dos RNAs mensageiros dos pacientes quando comparado com os controles. Entretanto, quando comparamos a expressão protéica em hipocampo de pacientes e controles, utilizando o método de imunistoquímica, encontramos não somente redução significativa no número de neurônios presentes em CA1 de pacientes, mas também redução importante nos neurônios positivamente marcados para VILIP-1, CASR e mGluR1. Estes achados sugerem que não

apenas mGluR1, mas também CASR e VILIP-1, estão associados à EH em pacientes com ELT.

Introdução

Epilepsia e Esclerose Hipocampal

Epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada por crises recorrentes, que são reações físicas repentinas, geralmente rápidas, causadas por descargas elétricas excessivas em um grupo de células no cérebro. Essas crises são sincronizadas e geralmente, não provocadas [1]. Um dos tipos mais comuns é a epilepsia de lobo temporal medial (ELT), representada por crises parciais complexas, originadas no lobo temporal que surgem em estruturas mediais tais como hipocampo [2, 3]. Segundo a Associação Brasileira de Epilepsia (www.epilepsiabrasil.org.br) crises parciais complexas são definidas como “crises que podem se iniciar como um aviso. O aviso pode ser uma sensação de sonho, de medo, opressão no estômago que sobe para a garganta, alucinações (ouvir sons, sentir cheiros e gostos estranhos) e outras que o paciente é incapaz de descrever com precisão. A essas sensações seguem-se perda de contato com o ambiente, aumento da salivação, movimentos de mastigação, de marcha, e/ou movimentos com as mãos. Após a crise o indivíduo volta progressivamente a ter contato com o meio”.

Com o tempo, observaram-se mudanças patológicas em indivíduos com ELT, sendo mais comum a esclerose hipocampal [4], diagnosticada através de imagens de ressonância magnética, caracterizada por atrofia hipocampal, formato anormal, perda de estrutura interna e de sinal hiperintenso T2 [5, 6]. Histologicamente, esclerose hipocampal está associada à perda neuronal, gliose e reorganização sináptica [7, 8].

Segundo a ILAE (*International League against Epilepsy*) existem alguns critérios mínimos para o diagnóstico de epilepsia de lobo temporal medial com esclerose hipocampal: perda neuronal e gliose em CA1 e endofolium; reorganização sináptica não

limitada às fibras musgosas e camada supragranular do giro denteado, dispersão das células granulosas e corpo das células granulares estendidos [9].

O tratamento clínico de ELT é feito utilizando drogas antiepilépticas, cujo principal alvo são as sinapses, incluindo aumento da transmissão inibitória do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico, diminuição da transmissão excitatória do neurotransmissor excitatório glutamato ou por interferência com vias de sinalização intracelular desses neurotransmissores [10]. Contudo, a resistência ao tratamento farmacológico é um problema clínico crucial em pacientes com ELT e a cirurgia de amígdalo-hipocampectomia seletiva, que consiste na retirada de parte do hipocampo, representa, em muitos casos, uma estratégia terapêutica. Estudos de material obtido de cirurgias de pacientes com ELT intratável revelaram que remoção da formação hipocampal danificada pode reduzir ou mesmo abolir as crises [11]. Acredita-se que a perda neuronal e esclerose hipocampal em ELT estejam associadas à excitotoxicidade provocada pelo glutamato [25]. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e é essencial na regulação das funções cerebrais e desenvolvimento neural [25]. Sua ação é possível através da ativação de dois tipos distintos de receptores: receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs). Os iGluRs são proteínas que controlam os canais dependentes de cátion relacionados à respostas excitatórias rápidas ao glutamato e são divididos em AMPA (2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid)/kainato e receptores NMDA (*N*-methyl *D*-aspartate). Ao contrário, os mGluRs se relacionam com respostas mais lentas e se acoplam a uma variada cascata de segundos mensageiros via proteína G heterodimérica [25].

Receptores que Acoplam a Proteína G

A maioria da transdução de sinais em resposta a hormônios, neurotransmissores, peptídeos, fatores de crescimento e odores assim como sinais físicos tais como a luz, são mediados por receptores transmembrana que acoplam a proteína G (*GPCR- G-protein-coupled receptors*) [12, 13].

Apesar da diversidade de ligantes receptores, a estrutura global de um GPCR é semelhante entre os receptores e consiste em 7 domínios transmembrana (TMs) α -hélices com 3 alças extracelulares e 3 alças intracelulares, uma porção extracelular N-terminal extracelular e uma porção C-terminal citoplasmática (Figura 1) [13-15].

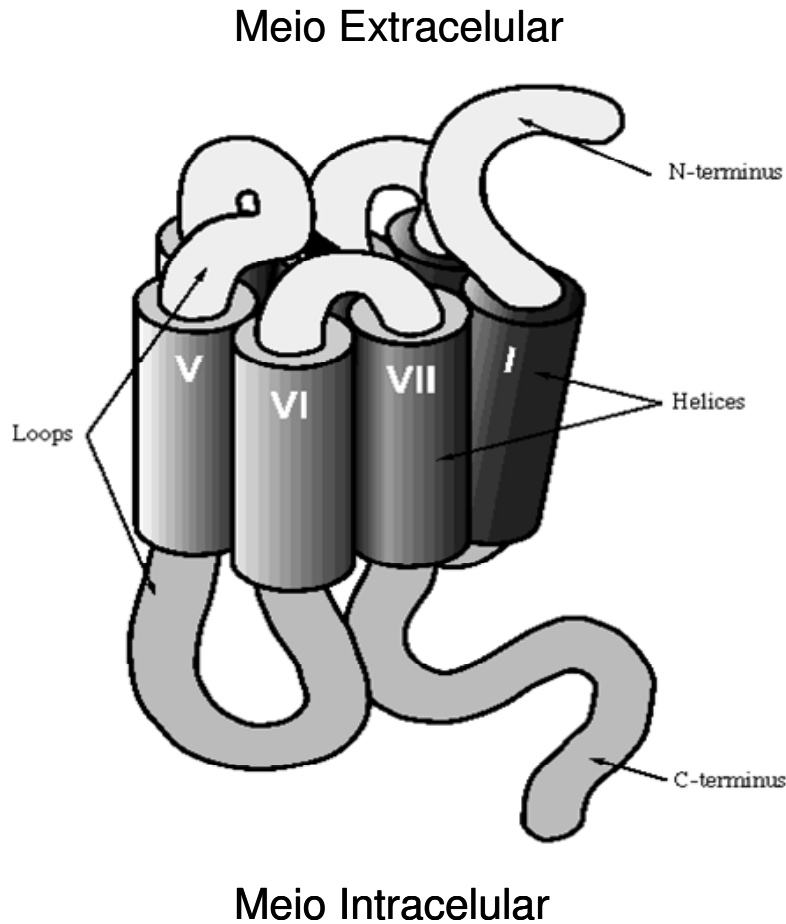


Figura 1- Característica estrutural de uma GPCR (adaptado de <http://www.gpcr.org/7tm/articles/JMM/Figures.html>).

Um complexo GPCR inclui o receptor, uma proteína G heterodimérica composta de uma subunidade α ligada a uma guanosina difostato (GDP) e das subunidades β e γ , um efetor e uma proteína reguladora da sinalização de proteínas G (*RGS- regulator G proteins*) [16-19]. As subunidades β e γ formam um complexo indissociável e representam uma unidade funcional. No estado basal, o complexo $\beta\gamma$, assim como a guanosina difostato (GDP) ligado à subunidade α estão associados. Quando ativados por agonistas, os GPCRs passam por uma mudança conformacional e interagem com o heterodímero da proteína G. Essa interação resulta na dissociação de GDP da subunidade α que é então substituído por GTP. A ligação do GTP à subunidade α induz uma mudança conformacional, que leva a

dissociação de subunidade α do complexo $\beta\gamma$. O GTP ligado à subunidade α , assim como o complexo $\beta\gamma$ são agora capazes de interagir com a proteína efetora e regular suas funções. As subunidades ativadas afetam suas moléculas alvo até a atividade GTPase intrínseca de $G\alpha$ hidrolisar o GTP para inativar o $G\alpha$ e causar sua reassociação com $\beta\gamma$, dessa forma, completando o ciclo. A ativação de efetores por α leva à amplificação do estímulo extracelular e a ativação ou inibição de moléculas de sinalização dependendo da natureza da proteína G: G_s estimula produção de adenilato ciclase, G_i inibe a produção de adenilato ciclase e G_q ativa fosfolipase C ($PLC\beta$) [20, 21]. O estímulo termina com a remoção do agonista [22, 23].

Baseado em diferenças estruturais, os GPCRs nos mamíferos são agrupados em três famílias principais: família A (ou Classe 1) em que estão os receptores semelhantes à rodopsina; família B (ou de Classe 2) em que estão os receptores semelhantes ao glucagon ou secretina; família C (ou de Classe 3) ao qual pertencem os receptores semelhantes aos receptores metabotrópicos de glutamato que incluem o receptor sensor de cálcio, receptores gustativos, receptores GABA_B, entre outros [24].

Receptores Metabotrópicos de Glutamato

Os mGluRs transmitem baixa ativação neural em mudanças de longa duração na atividade sináptica. Como consequência, sinalização de mGluR tem um papel importante na plasticidade sináptica (memória e aprendizagem, por exemplo) [27].

Após ser estimulado pelo ligante (glutamato), o receptor se desacopla de sua proteína G heterodimérica, é internalizado (endocitose) por compartimentos da membrana celular e diminui sua ação (*down regulation*). Tais acontecimentos permitem a dessensibilização do receptor para regulação de sua atividade, uma vez que a super

estimulação envolve excitotoxicidade levando à morte de células neuronais associado com isquemia aguda do cérebro e neurotrauma [28,31].

Pertencentes ao grupo 3 dos receptores que acoplam a proteína G, os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) possuem relação com diferentes aspectos de fisiologia e patologia no sistema nervoso central (CNS) [32]. Os mGluRs possuem ao menos 8 receptores diferentes. Tais receptores têm sido classificados em 3 principais subgrupos e são divididos de acordo com a homologia de suas sequências, segundos mensageiros acoplados e propriedades farmacológicas [25]. Os receptores mGluRs do Grupo I (mGluR-1, -3 e -5) estão acoplados à via de sinalização G_q . A ativação da subunidade α associada a G_q resulta na ativação de PLC β (fosfolipase C β), que estimula hidrólise de fosfatidilinositol 4,5 - bifosfato (PIP2) para gerar IP3 (inositol 1,4,5-trisfosfato) que leva à abertura de canais de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, causando a liberação deste íon e conseqüente estímulo da ativação da proteína quinase C (PKC) e ativação de canais de cálcio dependente de voltagem (Figura 2) [34, 35]. Além disso, também podem disparar uma variada cascata de sinalização e modular a atividade de canais ativados por íon e outros ligantes que se acoplam nele, transmitindo por várias vias de sinalização tais como PLC, adenilil ciclase, fosfolipase A2, fosfolipase D (PLD) e proteínas quinases [36, 37]. Membros dos grupos II (mGluR-2 e -3) e III (mGluR-4, -6, -7 e -8) são acoplados à via de sinalização G_i/G_o que inibem atividade adenilato ciclase e diminuem a formação de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). Em geral, mGluRs do grupo I são considerados excitatórios enquanto os receptores dos grupos II e III tem propriedades predominantemente inibitórias [38].

Eles possuem um grande domínio extracelular que tem homologia significativa com proteínas periplasmáticas ligadoras de bactérias (PBP, do inglês *periplasmic binding*

proteins). Baseado na comparação da sequência detalhada de aminoácidos, propõe-se que o domínio extracelular de mGluRs tem estrutura semelhante ao das PBPs pois compartilham a mesma estrutura do sítio de ligação com agonistas constituídos por 2 lobos separados por uma região de dobradiça, e vários estudos incluindo cristalografia de raio X indicam que esses lobos se fecham como uma “Venus” flytrap na presença do ligante. Dentro das bactérias, essas proteínas estão envolvidas no transporte de vários tipos de moléculas tais como aminoácidos, íons, açúcares e peptídeos. [33].

Demonstrou-se também que mGluRs -1,-3 e -5 (mGluRs do grupo I) são sensíveis a Ca^{2+} , enquanto mGluR2 é consideravelmente menos sensível ao íon [39]. Os 3 mGluRs sensíveis ao Ca^{2+} tem idênticas serinas e treoninas nos aminoácidos homólogos posicionados nos resíduos 165 e 188, respectivamente, em mGluR1a [40]. Enquanto que mGluR-2 tem um aspartato nessa posição. Além disso, troca de serinas por aspartato em mGluRs -1, -3 e -5, consideravelmente reduz a sensibilidade ao cálcio, e a inserção de serina em mGluR-2 substituindo aspartato, aumenta sua aparente afinidade por Ca^{2+} a um nível semelhante ao dos mGluRs do grupo I [39].

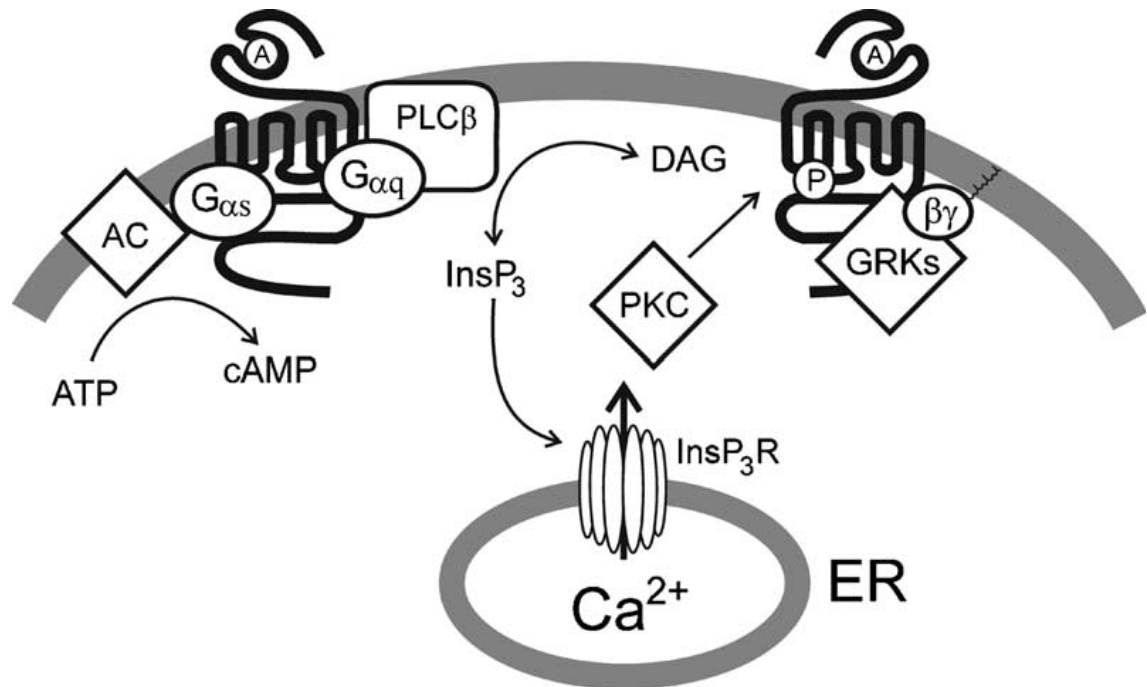


Figura 2-Representação esquemática da transdução de sinal de um mGluR1 (adaptada de L.B. Dale et al. / *Neurochemistry International* 41 (2002) 319–326).

Papel de mGluRs do grupo I em epilepsia

Os receptores mGluR do grupo I são encontrados principalmente pós-sinapticamente, com localização adjacente às margens da fenda sináptica. Sua ativação aumenta excitabilidade neural e facilita indução de potenciação da força sináptica (LTP) [27] assim como depressão da força sináptica (LTD) e internalização de receptores AMPA, resultados esses obtidos com a utilização de agonistas ativos de receptores do Grupo I, confirmando sua atividade pró-convulsivante [41, 42]. Contrariamente, antagonistas de mGluR do grupo I, seletivos para mGluR-1 (AIDA, LY367385) e para mGluR-5 (MPEP, SIB 1893) tem atividade anticonvulsivante em vários modelos experimentais de crises [43, 44].

Devido à atividade pró-convulsivante conhecida de mGluR1 em modelos animais, pesquisas têm sido realizadas sobre o papel desta proteína e de seu mRNA na doença epilepsia. Trabalhos utilizando imunistoquímica e PCR em tempo real mostraram

expressão aumentada de mGluR-1 em pacientes com ELT [45] quando comparados com controles sem epilepsia. Outro estudo utilizando apenas pacientes com esclerose hipocampal mostrou que tanto mGluR-1 como mGluR-5 possuem expressão aumentada na camada molecular do giro dentado e em CA1 [46].

Notenboom e colaboradores (2006) relataram aumento na imunoreatividade de mGluR-5 em hipocampo humano de pacientes com ELT quando comparado com pessoas sem epilepsia. No referido trabalho, a maior imunoreatividade foi observada em corpos celulares e dendritos apicais de neurônios hipocâmpais na camada molecular do giro dentado de pacientes com epilepsia de lobo temporal medial intratável. Imunoreatividade aumentada de mGluR-5 também foi observada em algumas células da glia. Ao contrário, imunoreatividade ao mGluR-1 não se mostrou diferente em lobo temporal de pacientes com epilepsia e controles provenientes de necropsia [47]. Essas características dão suporte à relação entre de receptores mGluR-5 e epilepsia de lobo temporal crônica.

Em outro estudo, observou-se aumentada imunoreatividade de receptores mGluR do grupo I em pacientes com epilepsia de lobo temporal medial, sugerindo que esses receptores podem facilitar um aumento na excitabilidade hipocâmpal e terminais pós-sinápticos [48].

Outros autores, contudo, mostraram reduzida expressão em mRNA para mGluR1 em hipocampo de pacientes com ELT, fato que pode estar associado com a perda de neurônios expressando este mRNA e com o tempo de duração das crises, pois observaram que é menor o nível de mRNA para mGluR1 quanto maior o número em anos de crise [49].

Um estudo com ratos que receberam estímulo na amígdala relatou mudanças no hipocampo de animais sacrificados 24h, 7 dias ou 28 dias após crises provocadas por estímulo elétrico. Utilizando a técnica de hibridização *in situ*, o trabalho mostrou transitório

aumento na regulação dos mRNAs *mGluR-1* e *mGluR-5*, sendo que os níveis de mGluR-1 mRNA decaíram no 7º dia após a crise e os níveis de mGluR-5 mRNA começaram a decair após 24h [50], sugerindo que a alteração nos níveis dos transcritos dependem do tempo que se passou após uma crise.

Um trabalho com o objetivo de delinear o papel de mGluR-1 e mGluR-4 em epileptogênese e dano hipocampal, gerou camundongos transgênicos superexpressando mGluR-1-EGFP e camundongo deficiente para mGluR-4 (mGluR4 KO) e, através da aplicação de pilocarpina, induziu epilepsia nesses dois modelos animais. Um aumento significativo na frequência e severidade das crises crônicas e recorrentes foi encontrado em camundongo mGluR-1-EGFP. Já os camundongos mGluR-4 KOs mostraram maior susceptibilidade as crises induzidas por pilocarpina quando comparado com camundongos controle que expressavam níveis normais de mGluR4. Esses resultados apontam para os papéis distintos de mGluR-1 e mGluR-4 em ELT. Aumento na expressão de mGluR-1 está relacionado ao agravamento da excitabilidade em epilepsia crônica com relação à frequência e severidade das crises. Ao contrário, mGluR-4 age como neuroprotetor e anti-crises. [51]

Receptor Sensor de Cálcio

Cálcio é um íon abundante e organismos multicelulares necessitam constantemente monitorar e ajustar as concentrações de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) nos fluidos corpóreos para manter um ambiente estável. Esse processo é denominado homeostase sistêmica de cálcio e requer um detector de cálcio extracelular. Outra proteína GPCR, o Receptor Sensor de Cálcio (CASR) é que tem a função de detectar e ajustar o $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Antes da identificação molecular deste sensor, já se sabia que aumento ou diminuição do cálcio

sistêmico ionizado (que é normalmente 1.2 mM) regula as concentrações séricas de hormônio paratormônio (PTH) [52]. A ativação de CASR inibe a secreção de PTH e promove excreção urinária de Ca^{2+} . Sua inativação, leva à secreção de PTH promovendo a liberação de Ca^{2+} dos ossos. Portanto, o CASR age para balancear mudanças na $[\text{Ca}^{2+}]_o$ através de um mecanismo de feedback negativo de secreção de PTH.

O gene de *CASR* humano está localizado no cromossomo 3q13.3-21 e se estende por mais de 50kb de DNA genômico, que está contido dentro do exon 6. A proteína CASR humana possui aproximadamente 120 kDa e pertence à família das proteínas que se acoplam à proteína G (GPCR) [53]. Ele pertence à subfamília do receptor metabotrópico glutamato, que compreende, entre outros, os mGluRs [54], o receptor GABA_B [55], receptores gustativos [56] e de ferormonas [57]. Os eventos que ocorrem em virtude da ativação do CASR são complexos e podem ser mediados por várias vias diferentes de sinalização. O CASR funcional se assemelha a um homodímero [58] que recruta a proteína G_q heterotrimérica, resultando em estimulação da atividade da fosfolipase C e subsequente mobilização de cálcio através da geração de inositol-1,4,5-trifosfato e ativação de proteína quinase C [59]. O CASR também pode se ligar e ativar $\text{G}_{i/o}$ e $\text{G}_{12/13}$ resultando em inibição da atividade de adenilato ciclase e estimulação de Rho-GEF (fator que media a troca do nucleotídeo guanina na proteína Rho), respectivamente [60]. Além disso, a porção intracelular do CASR pode se ligar diretamente à proteína Filamina-A e essa interação é necessária para estimulação das quinases ERK1 e ERK2 [61, 62].

Assim como nos receptores metabotrópicos de glutamato, na ativação de CASR, o agonista se liga ao domínio *Venus-flytrap-like* (VFT), dentro do domínio N-terminal extracelular do receptor (Figura 3). O domínio VFT está ligado ao domínio 7TM por um domínio rico em cisteína [63].

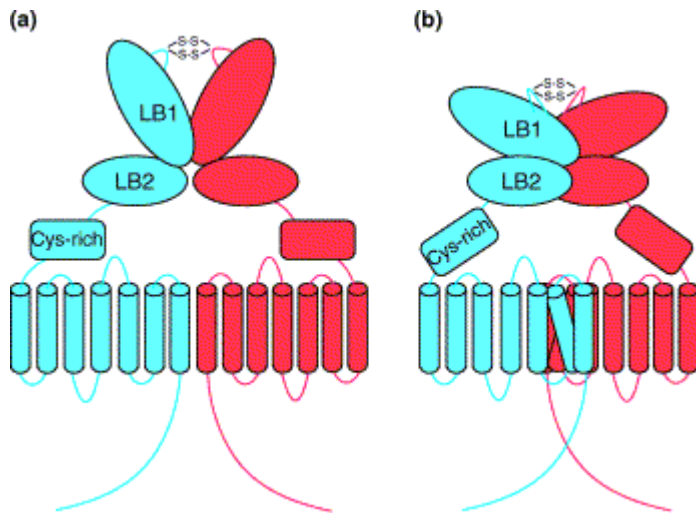


Figura 3- Estrutura de “Venus Flytrap” da proteína CASR (adaptado de Trends in Endocrinology).
 (a) forma inativa e (b) forma ativa após a ligação de um agonista

O CASR é expresso em paratireóides, rins e em outros tecidos não diretamente relacionados com homeostase de cálcio tais como intestinos, e cérebro [64, 65], porém, a função neuronal do receptor sensor de cálcio não está clara, contudo, várias publicações demonstram que ele é expresso em cérebro de mamíferos [66-69].

No sistema nervoso central, Ca^{2+} como segundo mensageiro está associado a quase todos os eventos celulares, incluindo proliferação e migração celular, função dos canais de íons, secreção de neurotransmissores, prolongamento dos axônios e crescimento dendrítico [70-75]. Foi demonstrado que a transmissão sináptica na região CA1 do hipocampo induz depleção transitória do cálcio extracelular [76], sugerindo que mudanças no $[Ca^{2+}]_o$ sejam detectadas pelo CASR que está presente nessas sinapses. Desativação do CASR levaria então à inativação da correspondente cascata de sinalização intracelular que modula a resposta sináptica e plasticidade. O possível papel do CASR na plasticidade sináptica foi sugerido com a demonstração de heterodimerização em neurônios, do CASR com mGluRs do grupo I. CASR e mGluR1 foram co-imunoprecipitados de cérebro bovino e co-

localizados em cérebro de ratos (na Purkinje cerebelar, nas áreas do hipocampo CA1, CA3 e giro denteado) [77].

O CASR é também expresso em células não-neuronais no cérebro (oligodendrócitos [78], astrócitos [79] e microglia [80]). Nas células gliais ele têm muitas funções diferentes incluindo sensibilidade, regulação iônica extracelular e de nutriente do meio para suportar viabilidade neural e especificamente, regular mudanças rápidas pela sinapse. O papel do CASR glial é incerto, podendo estar envolvido na resposta da célula glial à mudança do meio local.

Sua expressão foi confirmada em células piramidais de todas as camadas de hipocampo de rato e nas células granulares do giro denteado [81]. O mesmo estudo mostrou maior expressão da proteína e de mRNA de CASR entre 10° até 30° dias de vida em ratos, diminuindo após esse período até chegar no padrão de expressão da fase adulta e o maior aumento coincide com o tempo durante o qual potenciais de longa duração podem primeiramente ser induzidos nesses animais corroborando para a possibilidade de que o CASR tenha papel na indução de potenciação de longa duração (LTP). Em LTP há um aumento na eficiência sináptica seguido de estimulação das sinapses. Acredita-se que esse fenômeno seja um mecanismo celular para a formação e consolidação de memória. Ratos submetidos a crises induzida por kainato, mostraram aumento na regulação de CASR mRNA em CA1-CA2 e giro denteado da formação hipocampal [82]. Mutação no gene do *CASR* foi descrita em uma família do sudeste da Índia com epilepsia idiopática generalizada sugerindo uma associação com epilepsia [83]. Entretanto, não está claro se esta mutação resulta em perda ou ganho de função do receptor.

O papel do CASR no cérebro, não está definido. Devido à sua homologia com o mGluR1 incluindo a mesma via de sinalização intracelular, e a sua presença já descrita no

hipocampo, nós hipotetizamos que o receptor sensor de cálcio está envolvido na morte celular e na esclerose hipocampal em epilepsia de lobo temporal medial.

VILIP-1

A subfamília das “*Visinin-like protein*” (VSLN), pertencente à família das proteínas sensoras de cálcio neuronal (NCS), é composta das proteínas VILIP-1, VILIP-2, VILIP-3, hipocalcina e neurocalcina δ .

VILIP-1 é uma proteína de aproximadamente 22KDa codificada pelo gene 2p24.2 e embora sua expressão tenha sido detectada em órgãos periféricos (como coração, fígado, pulmão e testículos humanos), ela é expressa predominantemente no cérebro. Em humanos, o mapeamento da expressão dessa proteína por imunistoquímica mostrou expressão em neurônios de *septum* e *claustrum*, núcleos de base laterais, na subpopulação de neurônios piramidais em CA1 e CA4 de hipocampo, células nervosas na amígdala, cerebelo, tronco encefálico. Pouca imunorreatividade foi observada em hipotálamo e nenhuma marcação foi observada em tálamo e putamen caudado [84].

VILIP-1 é uma proteína que se liga ao cálcio com alta afinidade, se expressa na membrana celular, citoplasma e citoesqueleto, e possui uma sequência consenso M-G-X₃-S N-terminal que a capacita a se translocar para diferentes compartimentos subcelulares da membrana por um mecanismo chamado de “Ca²⁺-myristoil switch” que é dependente da ligação de Ca²⁺. Há evidências de que em meio sem Ca²⁺ a proteína se encontra retida em um compartimento hidrofóbico [85]. A ligação ao Ca²⁺ induz mudança conformacional que deixa a proteína disponível para a interação com membrana celular e/ou proteínas alvo [86]. Esse mecanismo foi observado em neurônios e acredita-se que funcione como um

mecanismo de transdução para ativação seletiva de cascatas de sinalização de receptores e moléculas efetoras de sinal [87].

Quando ocorre um aumento de Ca^{2+} intracelular suscitados por uma variedade de sinais extracelulares tais atividade elétrica e liberação de neurotransmissores, proteínas sensoras de Ca^{2+} assim como as VSNLs servem como efetoras para transdução de sinal causada pelo Ca^{2+} celular.

Mostrou-se que VILIP-1 influencia atividade adenilil ciclase e cAMP em alguns tipos celulares, entre eles células de rim de embriões humanos [88], linhagem de células β pancreáticas MIN6 [89] e em várias linhagens celulares de tumores de pele [90]. Redução na expressão de VILIP-1 mostrou reduzir os níveis de adenilil ciclase e de cAMP.

Em estudo sobre relação entre VILIP-1 e doenças que afetam o cérebro, detectou-se aumento nos níveis dessa proteína em fluido cérebro-espinhal de pacientes com doença de Alzheimer [91].

VILIP-1, assim como mGluR1, está associada a mudanças moleculares relacionadas à plasticidade hipocampal dependente do receptor *in vivo* e sabe-se que a ativação de mGluR pode funcionar como um disparo para a regulação hipocampal da expressão de VILIP-1, que assim como outras proteínas, pode levar a mudanças na sinalização neuronal durante plasticidade hipocampal, resultando em aumento ou redução da plasticidade de longa duração. A interação entre mGluRs e proteínas NCS poderia, dessa forma, corresponder a um mecanismo importante ligando a consolidação de potenciais de longa duração hipocampal e outras formas de plasticidade, influenciando aprendizado e memória em cérebro de mamíferos. No entanto, não há estudos associando VILIP-1 e esclerose hipocampal [92].

Anatomia do hipocampo

As três proteínas estudadas, VILIP-1, CASR e mGluR1 são expressas no hipocampo. O hipocampo é uma estrutura situada à posição medial dos dois lobos temporais, pósterio-inferiormente à amígdala. A formação hipocampal pode ser dividida em 3 regiões: o giro denteado (ou fascia denteada), corno de Ammon (ou hipocampo propriamente dito) e complexo subicular (Figura 4) [93]. O corno de Ammon e giro denteado são a parte mais simples do córtex, o allocortex (ou arqueocortex), quando comparados com o complexo isocortex.

Histologicamente, o corno de Ammon é dividido em 3 camadas: *stratum oriens*, *stratum pyramidale* e a zona molecular que é subdividida em *strata radiatum*, *lacunosum e moleculare* [94-96] (Figura 5). O *stratum oriens* é mal definido, principalmente em humanos, por estar subjacente ao *stratum pyramidale*. É composto de células nervosas espalhadas e é cruzado por axônios das células piramidais. O *stratum pyramidale* é a principal camada e contém os neurônios piramidais, os principais elementos do corno de Ammon. O *strata radiatum* consiste principalmente em dendritos apicais dos neurônios piramidais, arranjados paralelamente, o que dá aparência estriada a esta camada. O *stratum moleculare* toca o sulco hipocampal. Por causa do rápido desaparecimento do sulco durante o desenvolvimento, o *stratum moleculare* do corno de Ammon se funde com aquele do giro denteado. O *stratum moleculare* contém poucos neurônios que também são considerados interneurônios. A estrutura heterogênea aparece em cortes frontais do corno de Ammon, principalmente devido à diferença na aparência dos neurônios piramidais nas diferentes regiões.

O corno de Ammon é dividido em subregiões: CA1, CA2, CA3 e CA4 (CA= “*cornu ammonis*”). O *stratum pyramidale* de CA1 é grande em humanos, mas estreito e denso em ratos [97]. CA2 é composta por neurônios grandes, ovóides e uma camada de corpos celulares densamente compacta, tornando o *stratum pyramidale* denso e estreito, em contraste com CA1 [98].

CA3 corresponde à curva do corno de Ammon que entra na concavidade do giro denteado. Sua camada de neurônios piramidais é como aquela em CA2, mas sua densidade é menos marcada. CA4 está dentro da concavidade do giro denteado, e é isto que o distingue do CA3. Existem poucos neurônios nesse campo. Eles são ovóides, grandes e espalhados. Em secção transversa do corpo hipocampal, encontramos uma estrutura densa de lâmina dorsalmente côncava. Sua concavidade envolve CA4. Essa estrutura chama-se giro denteado.

O giro denteado é separado de CA1, CA2 e CA3 pelo sulco hipocampal que desaparece logo após seu desenvolvimento, embora persista uma cavidade residual. O corno de Ammon e o giro denteado estão juntos, mas artérias e veias frequentemente acompanham a rota inicial do sulco hipocampal, separando essas duas estruturas [99]. A estrutura do giro denteado é mais simples que a do corno de Ammon. As 3 camadas do aloctex são aqui claramente visíveis: o *stratum moleculare* e *granulosum* e a camada polimórfica. O *stratum granulosum*, a principal camada, contém corpos de neurônios granulares. O *stratum moleculare* é fino e separado do *stratum moleculare* do corno de Ammon pelo sulco hipocampal. A camada polimórfica (ou camada plexiforme) se une à camada granular de CA4. O giro denteado (fascia dentata) e CA4 constituem a *area dentata* [100] enquanto CA4 sozinho é às vezes chamado de *endofolium* ou hilo da fascia dentata.

No final do *stratum radiatum* de CA1 se encontra o limite entre corno de Ammon e o subiculum [98, 100, 101].

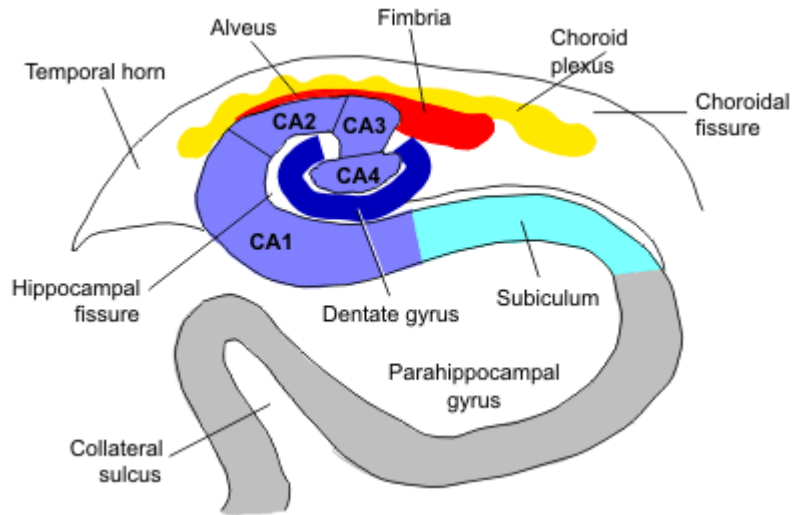


Figura 4- Anatomia do hipocampo (adaptado de www.spinwarp.ucsd.edu)

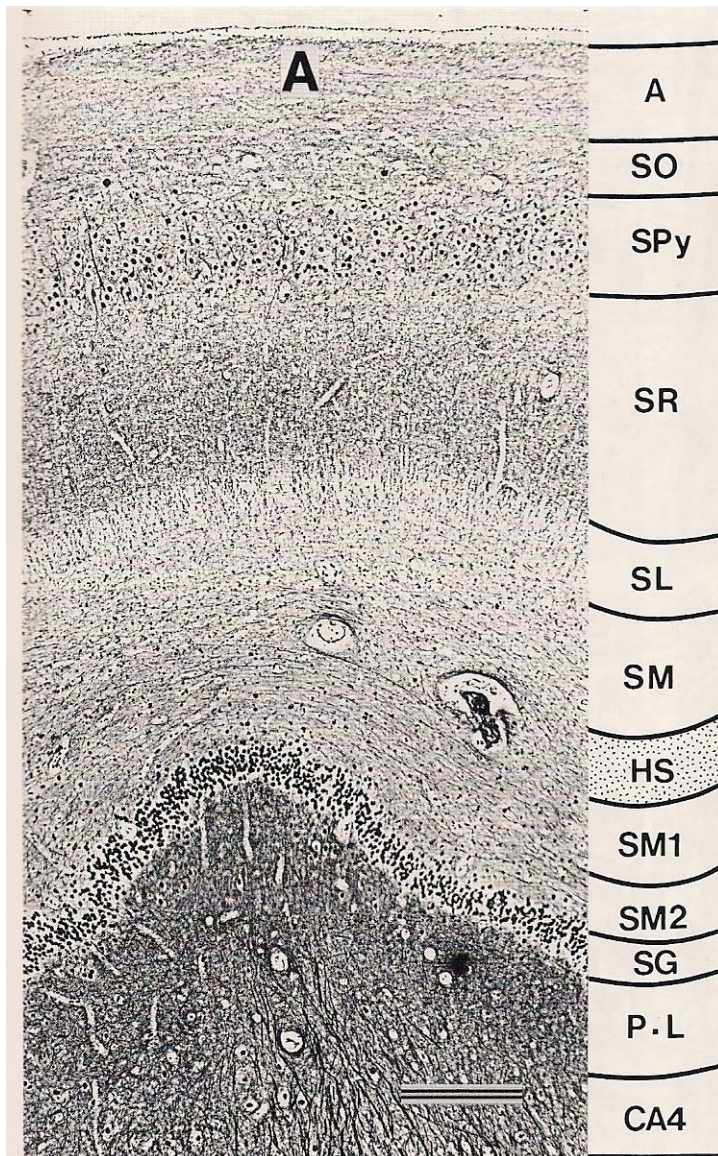


Figura 5- Estrutura do hipocampo. A= alveus; SO= stratum oriens; SPy= stratum pyramidale; SR= stratum radiatum; SL= stratum lacunosum; SM= stratum moleculare; HS= hippocampal sulcus; SM1 e SM2= stratum moleculare (giro denteado); SG= stratum granulosum; PL= camada polimórfica (Barra 600 µm) [102]

Objetivos

Objetivo Geral

➤ Analisar a expressão de VILIP-1, CASR e mGluR1 em hipocampo de pacientes com epilepsia de lobo temporal medial.

Objetivos Específicos

➤ Analisar o padrão de expressão em CA1 e a localização celular em neurônios piramidais das proteínas VILIP-1, CASR e mGluR1 em hipocampo de pacientes com epilepsia de lobo temporal medial e comparar com a expressão em controles.

➤ Verificar a expressão de RNA mensageiro de *VILIP-1*, *CASR* e *mGluR1* nesses pacientes e compará-los com controles.

Material e Métodos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Os pacientes foram informados dos objetivos da pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Tecidos

O critério para a inclusão de pacientes foi presença de esclerose hipocampal confirmada por imagens de ressonância magnética.

Foram processados 2 tecidos de hipocampos provenientes de necropsia de pessoas sem histórico de doenças neurológicas e 8 tecidos de hipocampos de pacientes provenientes de cirurgia para Epilepsia de Lobo Temporal Medial (amigdaló-hipocampectomia seletiva) submetidos ao procedimento no Hospital das Clínicas (HC) – Unicamp.

Os tecidos coletados foram divididos em duas partes, sendo que uma parte foi fixada em paraformaldeído 4% e a outra foi colocada em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA.

Imunoistoquímica

1. Processamento histológico

Fixação

A fixação se deu em solução de paraformaldeído 4% diluído em PBS (pH 7,4) por 24h e após esse período o material foi lavado em água corrente por 3 minutos e transferido para álcool etílico 70%.

Inclusão

Após passar pelo menos 24 horas em álcool etílico 70%, iniciou-se o processamento histológico conforme tabela abaixo:

Solução	Tempo	Temperatura
Álcool 80%	30'	60 ⁰ C
Álcool 90%	30'	60 ⁰ C
Álcool absoluto	30'	60 ⁰ C
Xilol I	30'	60 ⁰ C
Xilol II	30'	60 ⁰ C
Xilol III	30'	60 ⁰ C
Parafina I	30'	60 ⁰ C
Parafina II	30'	60 ⁰ C

Após o procedimento acima o material foi emblocado e em seguida cortado em micrótomo com espessura de 4 µm e colocado em lâminas silanizadas.

2. Reação de Imunoistoquímica

Procedeu-se a desparafinização das lâminas com banhos sucessivos de 30 segundos cada em: xilol I a 110⁰C, xilol II e xilol III, à temperatura ambiente, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III, álcool 80% e álcool 50%. As lâminas foram então lavadas em água corrente por 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado colocando-se as lâminas em três banhos sucessivos de água oxigenada 3% por 5 minutos cada. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente por 5 minutos e mergulhadas em água destilada. Para a recuperação antigênica utilizou-se panela a vapor, onde os tampões estavam à temperatura de 95⁰ C.

Para o VILIP1 utilizou-se o tampão Tris-Edta (10mM) pH 9,0 (Solução 1M: 12,11g de tris-hidroximetilaminometano, 3,70g de EDTA diluídos em 1L de água destilada). Para

os anticorpos CASR e mGluR1 utilizou-se o tampão citrato (10mM) pH 5,6 (Solução 1M: 19,21g de ácido cítrico diluídos em 1L de água destilada) por 30 minutos.

As lâminas foram incubadas por 30 minutos nos referidos tampões. Após esfriar, aproximadamente 20 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, enxaguadas em água destilada. Após este procedimento, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas utilizando leite desnatado, Nestlé® – Molico Cálcio Plus, a 3% em água destilada. As lâminas ficaram incubadas nessa solução por 30 minutos, temperatura ambiente. As lâminas foram enxaguadas com água destilada e colocadas em tampão PBS para posterior incubação com os anticorpos primários (policlonais) que obedeceram as seguintes diluições:

VILIP1 (coelho) – diluição 1:300

CASR (coelho) - diluição 1:500

mGluR1(coelho) - diluição 1:250

Os anticorpos VILIP-1, CASR e mGluR1 são provenientes de coelho e foram produzidos no Laboratório de Endocrinologia Pediátrica- FCM- Unicamp e foram diluídos em diluente específico para anticorpo primário (Novocastra IHC Diluent). As lâminas, incubadas em câmara úmida, ficaram em contato com o anticorpo primário por 30 minutos a 37°C e overnight a 4°C. As lâminas foram lavadas em 4 banhos sucessivos de 5 minutos cada em solução de PBS 10x. Para a visualização utilizou-se o sistema Advance™ HRP Enzyme (Dako North America, Inc.) seguindo as indicações do fabricante. Para a coloração as lâminas foram lavadas em dois banhos sucessivos de 5 minutos cada em PBS 10x. Adicionou-se aos cortes, previamente secos, 100 µl do cromógeno 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Dako North America, Inc.) por 5 minutos.

As lâminas foram lavadas por 5 minutos em água corrente e contra-coradas com hematoxilina (núcleo) por 40 segundos. Após outra lavagem em água corrente por 5 minutos as mesmas foram passadas em água amoniacal 1% e lavadas novamente por 5 minutos em água corrente. Para a montagem em meio permanente as lâminas passaram por três banhos sucessivos de álcool absoluto e, em seguida, por quatro banhos sucessivos de xilol. Após secagem parcial, foram montadas em meio de montagem a base de resina, Entellan, Merck.

3. Contagem das células e análise dos resultados

Em cada lâmina foram contados neurônios marcados e não marcados utilizando microscópio ótico e a lente panorâmica de 40X. Após a contagem, foi feita a proporção de neurônios piramidais positivos para as proteínas estudadas.

PCR em tempo Real

Foram usados primers e as sondas para os genes *VILIP-1*, *CASR* e *mGluR1*. Os genes *GAPDH* (*Human Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase*) e *HPRT1* (*Hypoxantine phosphoribosyltransferase 1*) foram utilizados como controle endógeno. Na reação utilizou-se 100ng de cDNA(6,25 µl de TaqMan, 0,625 µl de primer e sonda, 0,625 µl de água e 5 µl de cDNA). As condições do ciclo foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (passo de fusão) e 60°C por 1 min (anelamento/passo de extensão). Todos os experimentos de quantificação relativa foram feitos em triplicata. A expressão relativa dos genes *VILIP-1*, *CASR* e *mGluR1* foi determinada utilizando o programa 7500 System Software (*Applied Biosystem*).

Análise estatística

Para os resultados de imunistoquímica, este trabalho faz apenas uma análise descritiva dos resultados por impossibilidade de análise estatística. Para os resultados de PCR em tempo real foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

Resultados

Dos 8 tecidos de hipocampo de pacientes com epilepsia coletados nas cirurgias, todos demonstraram marcação positiva na imunohistoquímica para as proteínas de interesse: VILIP-1, CASR e mGluR1. Em 3 tecidos não foram identificados giro hipocampal e estes foram excluídos da análise. Nos 5 tecidos dos pacientes (Tabela 1) em que parte do Corno de Ammon estava preservada, CA1, principalmente *stratum pyramidale* e *stratum moleculare* eram visualizados, com apenas poucas amostras contendo CA2, CA3 e CA4. Consequentemente, analisamos a expressão das proteínas CASR, mGluR1 e VILIP-1 apenas na sub-região CA1.

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes estudados

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Lado da EH	Idade da primeira Crise	Forma de ELTM
P1	M	34,4	Direito	3 meses	Familiar
P2	F	22,1	Esquerdo	6 meses	Familiar
P3	F	54,9	Esquerdo	4 anos	Esporádico
P4	F	43,8	Bilateral (Esquerdo)	2 anos	Esporádico
P5	M	42,8	Direito	1 ano e 8 meses	Esporádico

M, masculino; F, feminino; entre parênteses, o lado mais afetado quando bilateral

Imunohistoquímica

Nos tecidos analisados, foi observada intensa gliose, com redução importante do número de neurônios piramidais e aumento do número de glia, confirmando a presença de esclerose hipocampal (Figura 6).

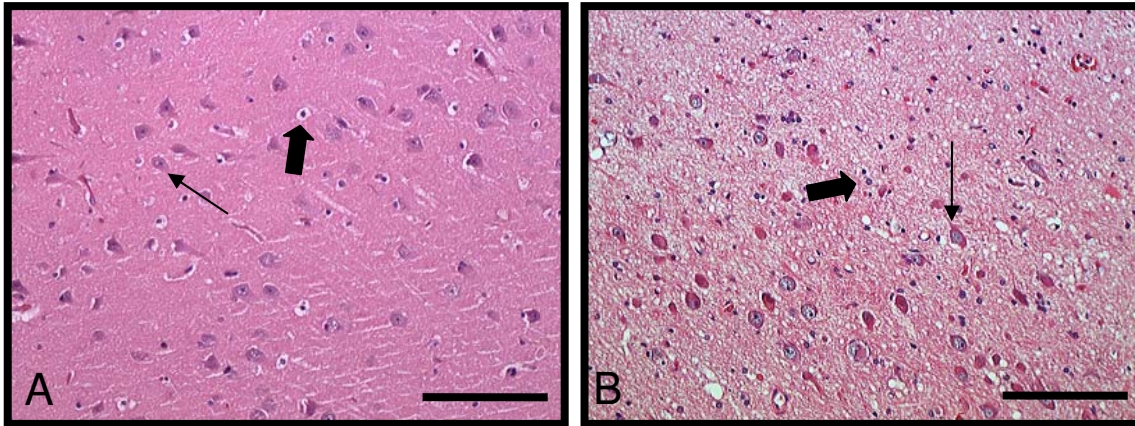


Figura 6- Histologia de *stratum pyramidale* de CA1.

Hipocampo controle (A) e de paciente com ELT (B) em cortes corados por hematoxilina-eosina (HE). A seta fina indica neurônios piramidais presentes em CA1 e a seta grossa indica células da glia. Panorâmica usada: 20X; escala da barra=100µm

Análise da Expressão e Localização de VILIP-1

Observamos na imunohistoquímica marcação positiva para VILIP-1 em uma menor proporção dos neurônios hipocâmpais nos tecidos controles, quando comparado com as outras proteínas analisadas sendo que aproximadamente 28% dos neurônios piramidais localizados no *stratum pyramidale de CA1* foram positivos para a marcação. A marcação, tanto nos controles quanto nos pacientes ocorreu em membrana citoplasmática de neurônios piramidais de CA1 (Figura 7). Além da redução no número de neurônios piramidais em tecidos de pacientes com epilepsia, houve redução importante da porcentagem de células positivas quando comparado com o grupo controle, sendo que apenas 10 a 21% dos neurônios piramidais apresentavam expressão de VILIP-1 (Tabela 2 e Figura 8).

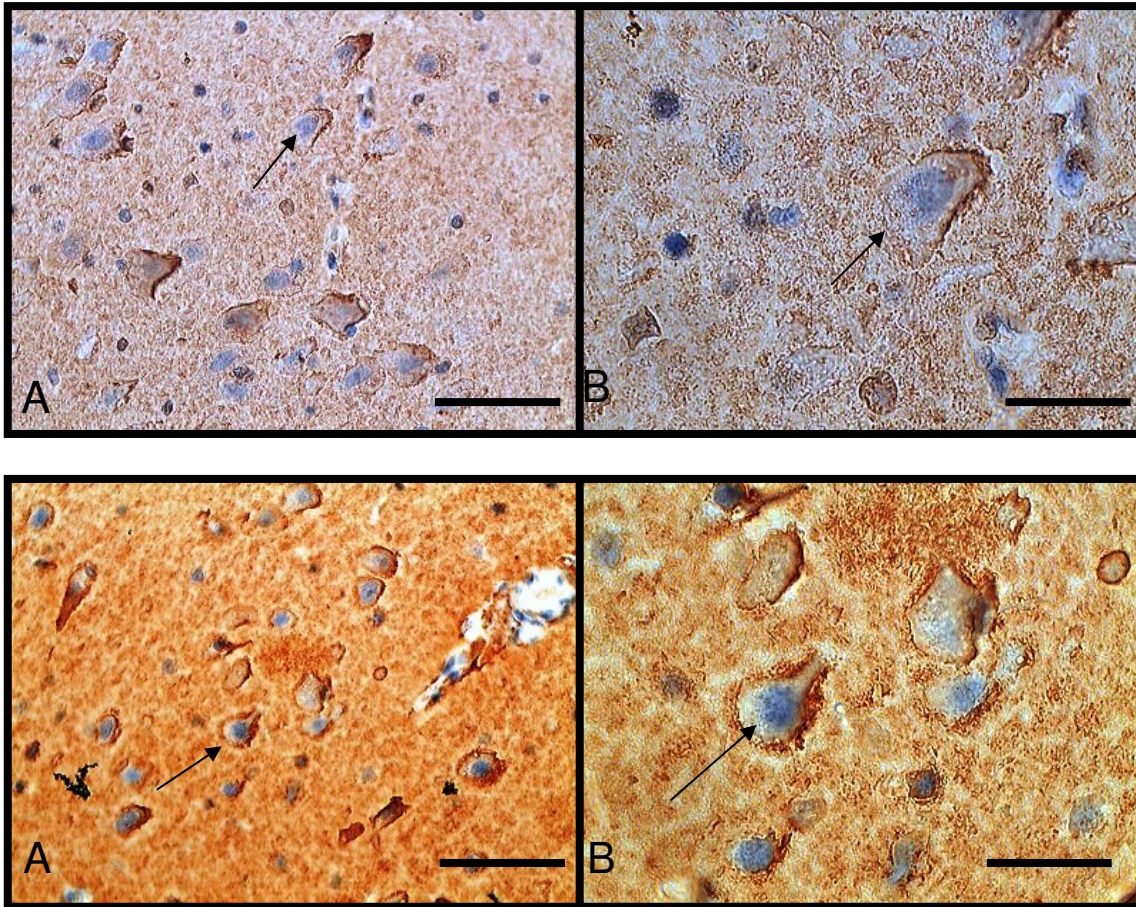


Figura 7- Imunoistoquímica de tecido hipocampal de controle (A e B) e paciente com ELT (C e D) marcado com anticorpo anti-VILIP-1 em neurônios piramidais de CA1. A seta indica um neurônio piramidal e mostra a expressão da proteína VILIP-1 principalmente em membrana plasmática, mas também em citoplasma. Panorâmicas utilizadas: A e C=40x; B e D= 100x. Escala da barra=50 μ m; (B,D) escala da barra=10 μ m.

Tabela 2- Porcentagem de Células Marcadas pelo Anticorpo anti-VILIP-1

Casos	Células Marcadas (%)
C1	26%
C2	30%
P1	12%
P2	11%
P3	21%
P4	16%
P5	16%

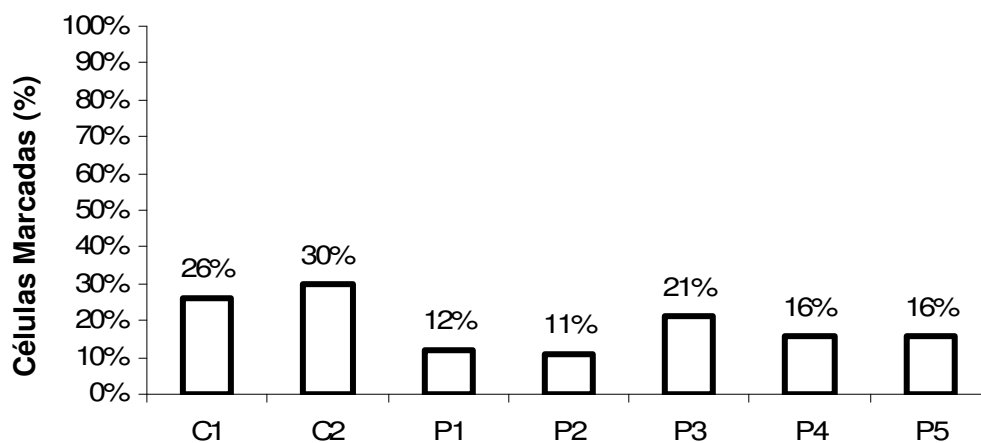


Figura 8- Expressão de VILIP-1 em neurônios piramidais de CA1. Porcentagem de neurônios marcados pelo anticorpo anti-VILIP-1 nos grupos controle (C) e paciente (P).

Análise da Expressão e Localização de CASR

Na análise da marcação para proteína CASR na imunistoquímica, aproximadamente 90% dos neurônios piramidais dos controles foram marcados pelo anticorpo anti-CASR (Figura 9). A expressão de CASR nos pacientes mostrou-se reduzida (com variação entre 78 e 36% de células positivas), em comparação com sua expressão nos controles (Tabela 3 e Figura 10).

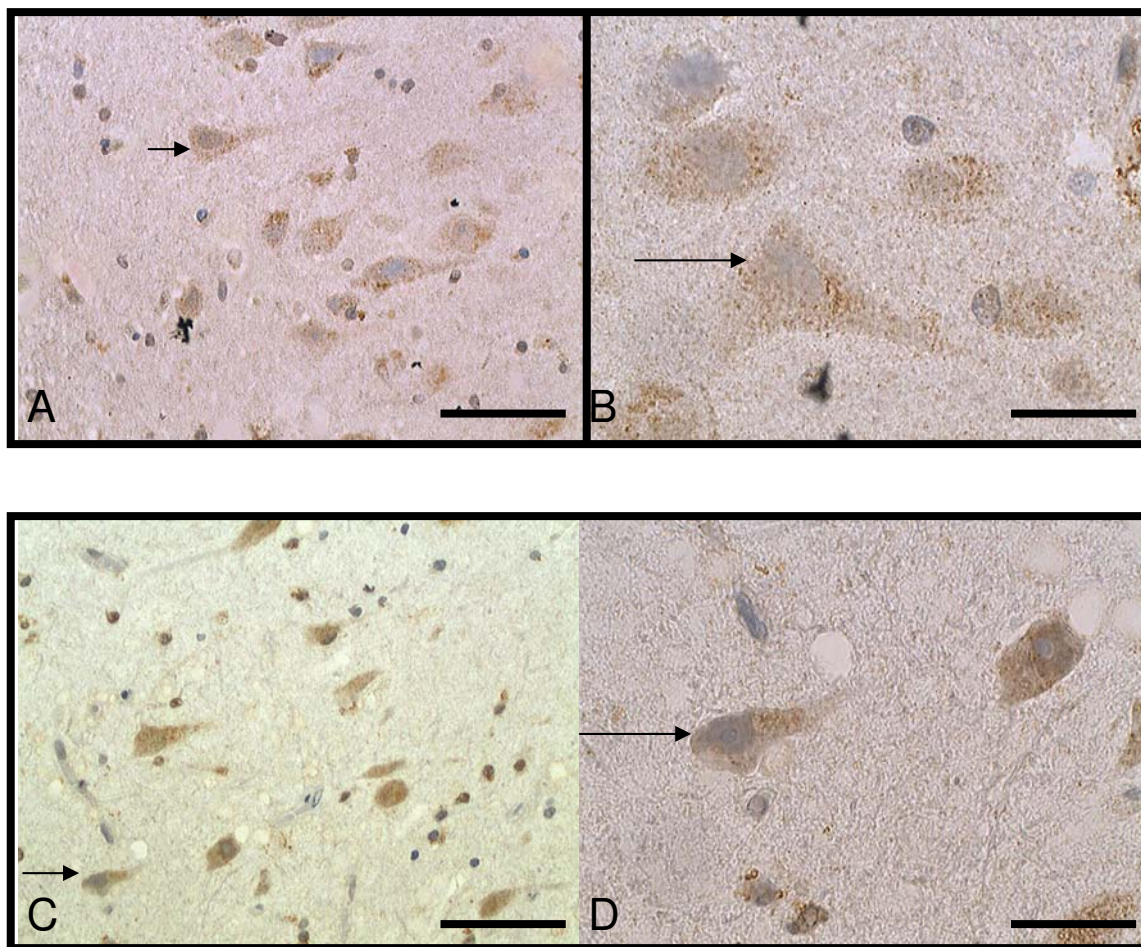


Figura 9- Imunoistoquímica de tecido hipocampal de controle (A e B) e paciente com ELT (C e D) marcado com anticorpo anti-CASR em neurônios piramidais de CA1. A seta indica neurônio marcado e demonstra a expressão da proteína CASR em membrana e citoplasma. Panorâmicas utilizadas: A e C=40x; B e D= 100x. Escala da barra=50µm; (B,D) escala da barra=10µm.

Tabela 3- Porcentagem de neurônios piramidais de CA1 marcados pelo anticorpo anti-CASR.

Casos	Células marcadas (%)
C1	90%
C2	90%
P1	58%
P2	75%
P3	39%
P4	78%
P5	36%

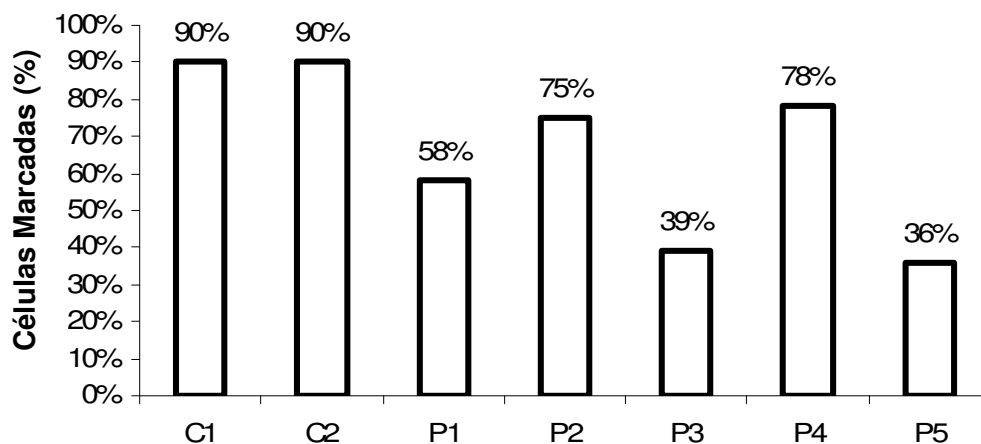


Figura 10- Expressão de CASR em neurônios piramidais de CA1. Porcentagem de neurônios marcados pelo anticorpo anti-CASR nos controles (C) e pacientes (P).

Análise da Expressão e Localização de mGluR1

Pela técnica de imunistoquímica, observamos marcação positiva para mGluR1 na maioria dos neurônios hipocâmpais dos tecidos controles, sendo que aproximadamente 90% dos neurônios piramidais localizados no *stratum pyramidale de CA1* foram positivos para a marcação. A marcação, tanto nos controles quanto nos pacientes ocorreu em membrana e citoplasma de neurônios piramidais de CA1 (Figura 11). Além da redução no número de neurônios piramidais em tecidos de pacientes com epilepsia, houve redução

importante da porcentagem de células positivas quando comparado com o grupo controle, sendo que apenas 21 a 39% dos neurônios piramidais apresentavam expressão de mGluR1 (Tabela 4 e Figura 12).

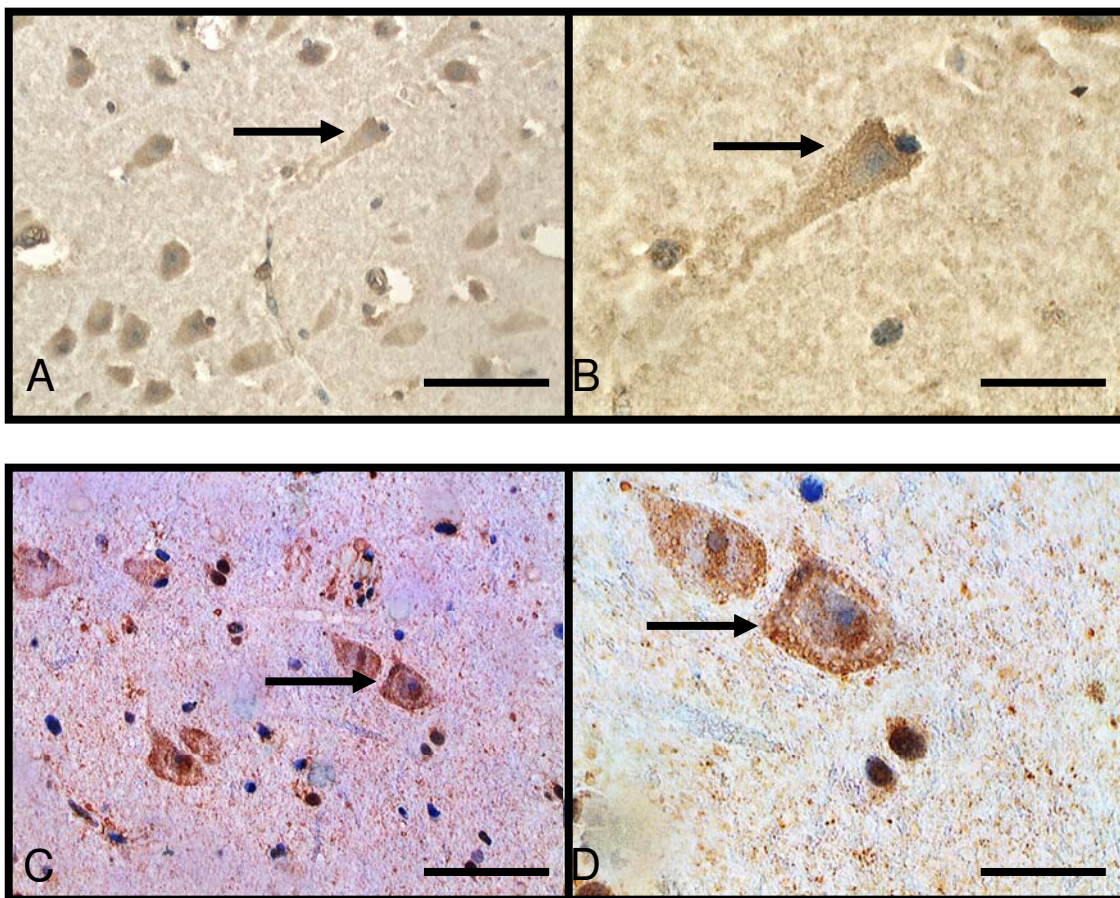


Figura 11- Imunoistoquímica de tecido hipocampal de controle (A e B) e paciente com ELT (C e D) marcado com anticorpo anti-mGluR1 em neurônios piramidais de CA1.

A seta indica um neurônio marcado mostrando expressão da proteína mGluR1 principalmente em membrana celular, mas também em citoplasma. Panorâmicas utilizadas: A e C=40x; B e D= 100x. Escala da barra=50µm; (B,D) escala da barra=10µm.

Tabela 4- Porcentagem de Células Marcadas pelo Anticorpo anti-mGluR1 em controles (C) e pacientes com ELT (P).

Casos	Células Marcadas (%)
C1	94%
C2	87%
P1	39%
P2	42%
P3	24%
P4	22%
P5	21%

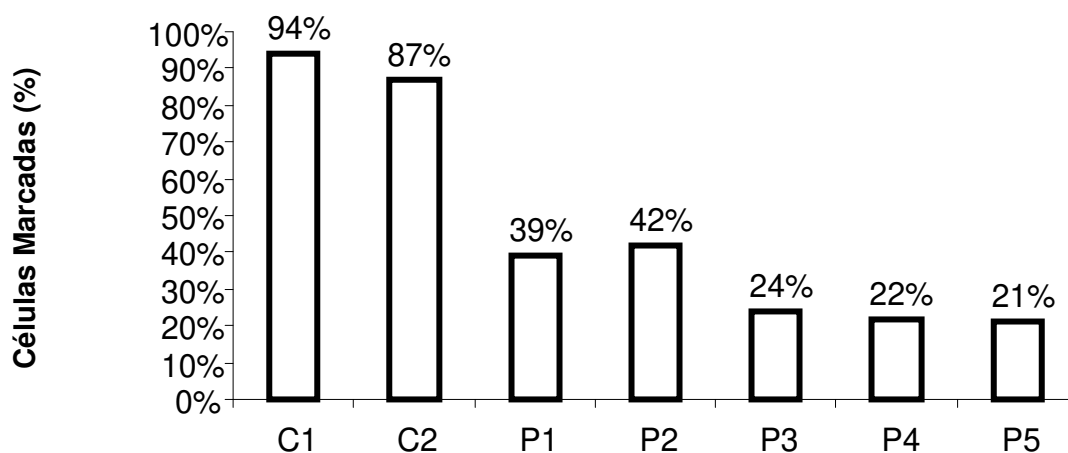


Figura 12- Expressão de mGluR1 em neurônios piramidais de CA1.

Porcentagem de neurônios marcados pelo anticorpo anti-mGluR1 nos controles (C) e pacientes (P).

Avaliação quantitativa da expressão de RNA por PCR em tempo real

Foram analisadas as expressões dos RNAs mensageiros (mRNAs) de *VILIP-1*, *CASR* e *mGluR1* por PCR em tempo real nos dois controles e cinco pacientes com ELT. O

transcrito de VILIP-1 (Figura 13-A) apresentou expressão relativa entre 0,696 a 2,06, com controles tendo expressão de 1 e 1,182. Em relação ao mRNA de CASR (Figura 13-B), a variação na expressão relativa foi de 0,104 a 12,937, com expressão de 1 e 0,116 nos controles. Houve uma expressão significativamente alta de CASR no paciente 4. Este experimento foi repetido várias vezes para afastar erros de concentração de RNA, porém os resultados persistiram. Para o transcrito de mGluR1 (Figura 13-C) nos pacientes com ELT, encontramos uma expressão relativa variando entre 0,725 a 1,624 enquanto que para os controles houve expressão de 1 e 1,896. A expressão dos mRNAs das três proteínas mostrou-se variável pois em alguns casos as expressão dos mRNAs se encontravam baixa e em outros aumentadas em relação aos controles. As expressões dos três mRNAs também se mostraram discordantes entre si em relação aos controles (Figura 13-D).

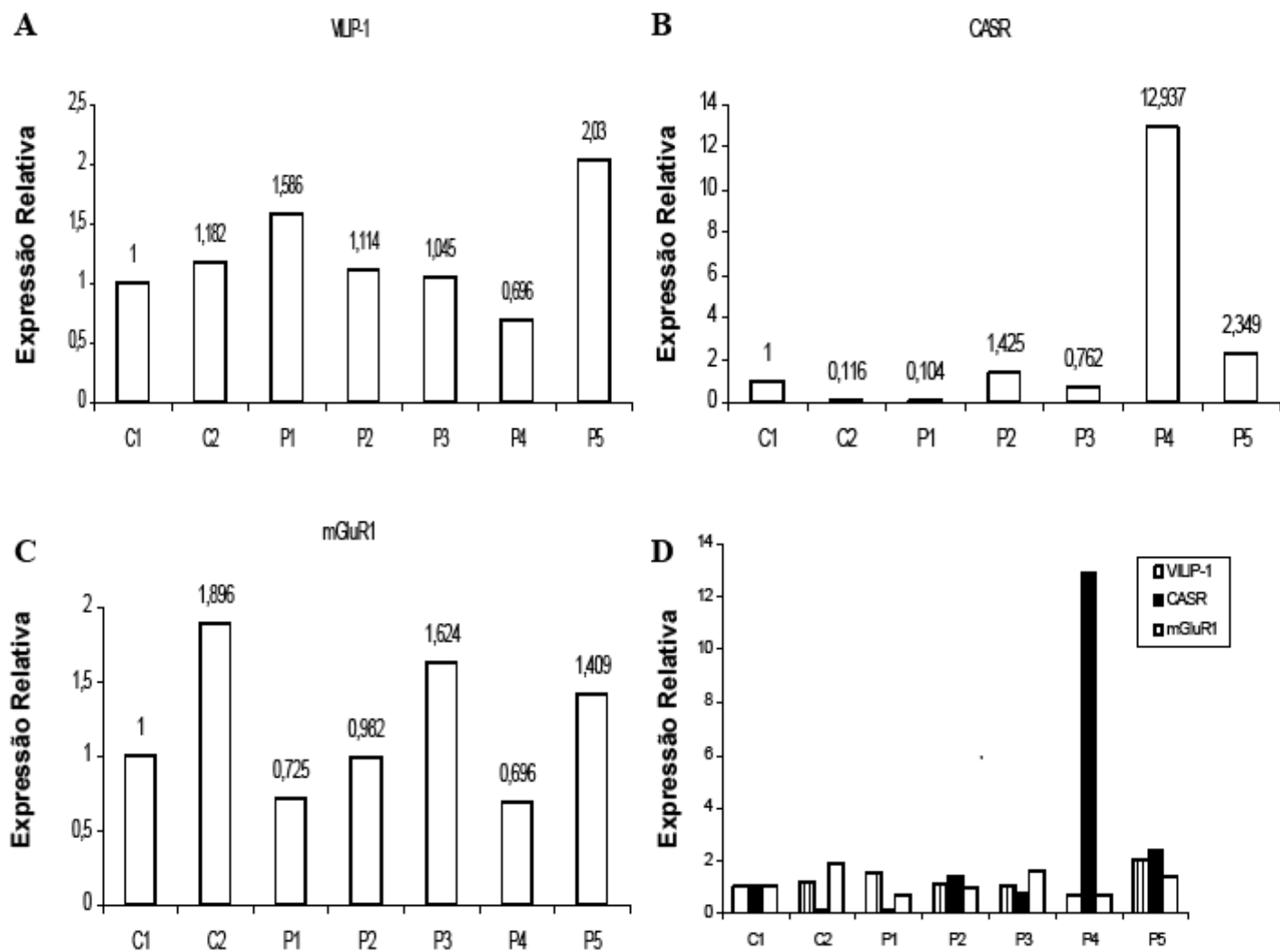


Figura 13- Expressão relativa dos RNAs mensageiros de VILIP-1 (A); CASR (B) e mGluR1 (C) e de todos (D) por PCR em tempo real de tecido hipocampal de controles (C) e Pacientes (P).

Discussão

Em nosso estudo, analisamos a expressão das proteínas VILIP-1, CASR e mGluR1 e da mensagem dos RNAs *VILIP-1*, *CASR* e *mGluR1* em hipocampos de pacientes com epilepsia de lobo temporal medial submetidos à amigdaló-hipocampectomia em comparação com controles. VILIP-1 é uma proteína que apresenta localização reversível em diferentes compartimentos celulares tais como complexos adaptadores, estruturas do citoesqueleto, membranas plasmática e intracelular e moléculas efetoras [104]. Sabe-se também que VILIP-1 é regulada pelo mGluR1 em potenciação de longa duração na plasticidade sináptica [105], por isso nosso interesse foi analisar a expressão deste sensor neuronal de cálcio. Outra proteína com função de detectar e ajustar a concentração de cálcio no meio extracelular, o CASR, tem sua função bem descrita em paratireóide, porém, apesar de bem expresso no cérebro, sua função no SNC ainda não está bem definida. Sabe-se que ocorrem mudanças nos níveis de cálcio extracelular em torno das sinapses e que transmissão sináptica induz depleção transitória de cálcio extracelular em CA1 de hipocampo [76, 103], o que prova a importância de Ca^{2+} em atividade cerebral. Além disso, mutação no gene *CASR* foi encontrada em integrantes de família com epilepsia idiopática generalizada, porém não está claro seu papel nesta doença [83].

O mGluR1 um receptor de glutamato, o neurotransmissor excitatório mais abundante no cérebro e sua importância na gênese da epilepsia já está bem estabelecida embora haja controvérsias no seu papel na doença.

Dados da literatura mostram controvérsia em relação à expressão de mGluR1 em ELT. De um lado autores mostram que em modelos animais de epilepsia e em humanos com ELT há aumento na expressão da proteína mGluR1 [46, 106], porém há relato de

diminuição no transcrito *mGluR1* e proteína em humanos com ELT comparado com controles humano e não humano [49].

Em hipocampus humanos, mGluR1 é principalmente expresso em corpos neuronais em CA1 e CA3 [107], as subregiões onde ocorre a maior perda celular em casos de epilepsia de lobo temporal medial [108-110].

A perda neuronal seletiva associada com excitotoxicidade ocorre em regiões que são vulneráveis a mudanças na permeabilidade a Ca^{2+} [49]. Estudos em modelos animais de epilepsia mostraram que as regiões hipocampais mais vulneráveis (hillus, CA1 e CA3) têm maior número de neurônios com níveis reduzidos de proteínas ligadoras de Ca^{2+} (*Ca²⁺-binding protein*) quando comparados com outras regiões menos vulneráveis a crises contínuas, sugerindo-se a possibilidade de que a abundância de mGluR1 nessas regiões aumente a entrada de Ca^{2+} nas células expondo neurônios hipocampais de regiões específicas em risco de dano excitatório [111].

Grigorenko *et al.* (1997) identificou através PCR em tempo real e de Western blot redução tanto na expressão gênica como protéica de mGluR1 e aponta 2 possíveis causas responsáveis por esta diminuição: (1) pode ocorrer alteração na expressão nos neurônios sobreviventes em hipocampo com epilepsia refratária ou (2) a redução na expressão devido à morte de células expressando mGluR. A hipótese mais aceita é a de que diminuição de mGluR1 em hipocampo de pacientes com ELT ocorra devido à degeneração seletiva dos neurônios com expressão da proteína [108, 112].

Nosso estudo mostrou expressão protéica de mGluR1 difusa, tanto em controles como em pacientes, em todas as áreas de CA, giro dentado e em glias, entretanto focamos nosso estudo na sua expressão em neurônios piramidais de CA1. Os resultados de expressão de mRNA contrastaram com os de imunistoquímica onde houve redução no

número de neurônios positivos para proteínas VILIP-1, CASR e mGluR1 quando comparados com tecidos controles, enquanto que para os mRNAs *VILIP-1*, *CASR* e *mGluR1* não encontramos diferença de expressão entre controles e pacientes. Uma hipótese para justificar este resultado é o fato de que a imunistoquímica não é um método quantitativo, e não permite avaliar a intensidade de expressão protéica nas células. Com isso, não podemos excluir a hipótese de que há aumento da expressão de mGluR1 nas células remanescentes na tentativa de compensar a perda neuronal. Devido a limitações técnicas, a expressão gênica foi realizada com tecido hipocampal total e não apenas com CA1 o que pode justificar as variações de expressão encontradas no PCR em tempo real.

Grigorenko *et al.* (1997) observou menor nível do mRNA de *mGluR1* quanto maior o número em anos de crise. Considerando os pacientes avaliados neste trabalho que apresentam maior número de anos com crise (P1 e P2 com crises iniciadas aos 3 e 6 meses de idade, respectivamente), não apresentaram menor nível de expressão do mRNA mGluR1 quando comparado com P4 (com crise iniciada aos 2 anos), mas apresentam expressão reduzida do mRNA quando comparado com P3 e P5 (com crise iniciada aos 4 anos e 1 ano e 8 meses, respectivamente). O alto grau de expressão de *CASR* no paciente 4 pode estar associado à área analisada, uma vez que foi usado tecido hipocampal total. De interesse, paciente 4 é o único com esclerose hipocampal bilateral.

Durante a pesquisa nos deparamos com alguns fatores limitantes, entre eles: dificuldade de obter material de cirurgia de pacientes com ELT, a qualidade do material cirúrgico e a dificuldade de conseguir material controle. Muitas vezes a abordagem cirúrgica não permitiu uma análise histológica do tecido retirado, devido à aspiração do material e nem sempre identificamos as estruturas de interesse no material retirado. Devido a estas dificuldades, houve perda de amostras de 3 pacientes. A disponibilidade de tecidos

controles com poucas horas *pós-mortem* também é escassa, o que limita a possibilidade a análise estatística de nossos resultados. Entretanto, apesar do número limitado de controles e pacientes, devido à grande dificuldade de acesso a este material humano, nossos dados têm sua importância.

Considerando a semelhança entre as proteínas mGluR1 e CASR e a heterodimerização entre elas, descrita por Gama *et al.* (2001) em cultura de células de cérebro bovino, nossos resultados sugerem modulação da expressão de CASR em pacientes com ELT. Contudo, a relação entre mGluR1 e CASR em cérebro e o papel de CASR em mudanças na permeabilidade neuronal ao cálcio em pacientes com epilepsia permanece mal elucidada.

VILIP-1 tem capacidade de, através de mudança conformacional, migrar para a membrana em resposta à sinalização por cálcio. Após aumento nas concentrações de cálcio intracelular, VILIP-1 transloca-se para a membrana celular, mecanismo molecular detalhado por cristalografia e ressonância nuclear magnética [113] e demonstrado também em neurônios hipocâmpais [114]. Neste trabalho, resultados de imunistoquímica mostraram a expressão da proteína VILIP-1 principalmente na membrana citoplasmática de neurônios piramidais de CA1, tanto em pacientes quanto nos controles, sugerindo o estímulo por cálcio nesta subregião do hipocampo está contribuindo para a localização desta proteína.

Conclusão

Nossos resultados demonstraram a presença de EH nos tecidos hipocâmpais de pacientes com ELT com redução no número de neurônios em CA1 e presença de intensa gliose. Além disso, houve redução no número de neurônios piramidais marcados para VILIP, CASR e mGluR1, sugerindo que não apenas mGluR1, mas também CASR e VILIP estão alterados em hipocampo de pacientes com ELT. O uso da imunistoquímica permitiu comparar expressões de CASR e VILIP-1 em humanos com ELT com controles, produzindo resultados não descritos anteriormente na literatura. Entretanto, persiste a dúvida quanto ao grau de expressão destas proteínas em CA1. Futuras pesquisas se farão necessárias para elucidar diferenças moleculares entre indivíduos controles e com ELT individualizando as diferentes regiões hipocâmpais.

Referências

- [1] Hauser WA, Anneger, JF, Rocca, WA. Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic* 1996;71:576-586.
- [2] Margerison JH, Corsellis, JAN. Epilepsy and the temporal lobes. *Brain*. 1966;89:499-530.
- [3] Liu Z, Mikati, M, Holmes, GL. Medial Temporal Sclerosis: pathogenesis and significance. *Pediatric Neurology*. 1995;12:5-16.
- [4] Lothman EW, Bertram, EH, Stringer, JL. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Progress in neurobiology*. 1991;37:1-82.
- [5] Cascino G, Jack, CRJr, Parisi, JE, Sharbrough, FW, Hirschorn, K A, Meyer, FB, Marsh, WR, O'Brien, PC. Magnetic resonance imaging-based volume studies in temporal lobe epilepsy: pathological correlations. *Annals of Neurology*. 1991;30:31-36.
- [6] Cendes F, Andermann, F, Gloor, P, Evans, A, Jones-Gotman, M, Watson, C, Melanson, D, Olivier, A, Peters, T, Lopes-Cendes, I, Leroux, G. MRI volumetric measurements of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 1993;43:719-725.
- [7] Thom M. Hippocampal sclerosis: progress since sommer. *Brain Pathology*. 2009;19:565-572.
- [8] Blumcke I KI, Clusmann H, Schramm J, Becker AJ, Elger CE, Bien CG, Merschhemke M, Meencke HJ, Lehmann T, Buchfelder M, Weigel D, Buslei R, Stefan H, Pauli E, Hildebrandt M. Towards a clinico-pathological classification of granule cell dispersion in human mesial temporal lobe epilepsies. *Acta Neuropathologica*. 2009;117:535-544.
- [9] Wieser HG. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 2004;45:695-714.
- [10] Landmark CJ. Targets for antiepileptic drugs in the synapse. *Medical Science Monitor*. 2007;13(1):1-7.
- [11] Olivier A. Temporal resections in the surgical treatment of epilepsy. In: Theodore WH editor. *Surgical treatment of epilepsy*. 1992;Amsterdam: Elsevier Science,175-188.
- [12] Watson S, Arkininstall, S. In: Watson, S., Arkininstall, S. editors. . *The G-Protein linked Receptor*. Facts Book London: Academic Press. 1994;1-291.
- [13] Ji TH, Grossmann, M, Ji, I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273: 17299-17302.
- [14] Baldwin JM. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *The EMBO journal*. 1993;12:1693-1703
- [15] Strader CD, Fong, TM, Graziano, MP, Tota, MR. The family of G-protein-coupled receptors. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995;9:745-754.
- [16] Hepler JR, Gilman, AG. G proteins. *Trends in biochemical sciences*. 1992;17: 383-387.
- [17] Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*. 1995;80(2):249-57.
- [18] Gudermann T, Kalkbrenner, F, Schultz, G. Diversity and selectivity of receptor-G-protein interaction. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1996;36:429-460.

- [19] Hamm HE, Gilchrist, A. Heterotrimeric G-proteins. *Current opinion in cell biology*. 1996 8:189–196.
- [20] Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:669-672.
- [21] Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annual review of biochemistry*. 2001;70:281-312.
- [22] Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signal. *Annual review of biochemistry*. 1987;56:615-649.
- [23] Ross EM, Wilkie, TM. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annual review of biochemistry* 2000;69:795-827.
- [24] Klabunde T, Hessler, G. Drug Design Strategies for Targeting G-Protein-Coupled Receptors. *ChemBioChem*. 2002;3:928-944.
- [25] Conn PJ, Pin, J-P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1997;37: 205-237.
- [26] Stephan D, Bon, C, Holzwarth, JA, Galvan, M, Pruss, RM. Human metabotropic glutamate receptor 1: mRNA distribution, chromosome localization and functional expression of two splice variants. *Neuropharmacology*. 1996;35 (12):1649-1660
- [27] Riedel G, Reymann, KG. Metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term potentiation and learning and memory. *Acta physiologica Scandinavica*. 1996;157:1–19.
- [28] Nicoletti F, Brunom, V., Copanim, A., Casabona, G., Knopfel, T. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends in Neurosciences*. 1996;19: 267–271.
- [29] Alessandri B, Bullock, R. Glutamate and its receptors in the pathophysiology of brain and spinal cord injuries. *Progress in brain research*. 1998;116: 303-330.
- [30] Bordi F, Ugolini, A. Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Progress in Neurobiology*. 1999;59:55–79.
- [31] Calabresi P, Centonze, D., Pisani, A., Bernardi, G. Metabotropic glutamate receptors and cell-type-specific vulnerability in the striatum: implications for ischemia and Huntington's disease. *Experimental Neurology*. 1999;158:97–108.
- [32] De Blasi A, Conn, PJ, Pin, JP, Nicoletti, F. Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2001;22 (3):114-120.
- [33] O'Hara PJ, Sheppard, PO, Thøgersen, H, Venezia, D, Haldeman, BA, McGrane, V, Houamed, KM, Thomsen, C, Gilbert, TL, Mulvihill, ER. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron*. 1993;11: 41–52.
- [34] Aramori I, Nakanishi, S. Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron*. 1992;8:757–765.
- [35] Francesconi A, Duvoisin, R. M. Opposing effects of protein kinase C and protein kinase A on metabotropic glutamate receptor signaling: selective desensitization of the inositol trisphosphate/Ca²⁺ pathway by phosphorylation of the receptor-G protein-coupling domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:6185–6190.

- [36] Hermans E, Challiss, R. A. Structural, signaling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G protein-coupled receptors. *The Biochemical journal*. 2001;359:465–484.
- [37] Valenti O, Conn, P.J., & Marino, M.J. Distinct physiological roles of the Gq-coupled metabotropic glutamate receptors co-expressed in the same neuronal populations. *Journal of Cellular Physiology*. 2002;191:125–137.
- [38] Ure J, Baudry, M, Perassolo, M. Metabotropic glutamate receptors and epilepsy. *Journal of the Neurological Sciences*. 2006;247:1–9.
- [39] Kubo Y, Myashita, T., Murata, Y. Structural basis for a Ca^{2+} -sensing function of the metabotropic glutamate receptors. *Science*. 1998;279:1722–1725.
- [40] Brauner-Osborne H, Jensen, A.A., Sheppard, P.O., O'hara, P., Krogsaard-Larsen, P.J. . The agonist-binding domain of the calciumsensing receptor is located at the amino-terminal domain. 274:18382–18386. 1999; *The Journal of Biological Chemistry*.
- [41] Tizzano JP, Griffeya, KI, Schoepp, DD. Induction or protection of limbic seizures in mice by mGluR subtype selective agonists. *Neuropharmacology*. 1995;34:1063–1067
- [42] Watabe AM, Carlisle, HJ, O'Dell, TJ. Postsynaptic induction and presynaptic expression of Group 1 mGluR-dependent long-term depression in the hippocampal CA1 region. *Journal of Neurophysiology*. 2002;87:1395–1407.
- [43] Thomsen C, Klitgaard, H, Sheardown, M, Jackson, HC, Eskesen, K, Jacobsen, P, Treppendahl, S, Suzdak, PD. (S)-4-Carboxy-3-hydroxy-phenylglycine, an antagonist of metabotropic glutamate receptor (mGluR1a) and an agonist of mGluR2, protect against audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Journal of Neurochemistry*. 1994;62:2492-2495.
- [44] Ghauri M, Astrid, G, Meldrum, B, Brian, S. Convulsant and anticonvulsant action of agonists and antagonists of group III mGluRs. *NeuroReport*. 1996;7:1469–1474.
- [45] Blümcke I, Becker, AJ, Klein, C, Schiewe, C, Lie, AA, Beck, H, Waha, A, Friedl, MG, Kuhn, R, Emson, P, Elger, C, Wiestler, OD. Temporal Lobe Epilepsy Associated Up-Regulation of Metabotropic Glutamate Receptors: Correlated Changes in mGluR1 mRNA and Protein Expression in Experimental Animals and Human Patients. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2000;59(1):1–10.
- [46] Tang FR, Lee, W.L, Yeo, T.T. Expression of the group I metabotropic glutamate receptor in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurocytology*. 2001;30:403-411.
- [47] Notenboom RGE, Hampson, DR, Jansen, GH, Van Rijen, PC, van Veelen, CWM, Van Nieuwenhuizen, O, De Graan, PNE. Up-regulation of hippocampal metabotropic glutamate receptor 5 in temporal lobe epilepsy patients. *Brain*. 2006;129:96-107.
- [48] Tang FR, Lee, W.L., Yeo, T.T. Expression of the group I metabotropic glutamate receptor in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurocytology*. 2001; 30:403-11.
- [49] Grigorenko E, Glazier, S, Bell, W, Tytell, M, Nosel, E, Pons, T, Deadwyler, SA. Changes in glutamate receptor subunit composition in hippocampus and cortex in patients with refractory epilepsy. *Journal of Neurological Sciences*. 1997;153:35–45.
- [50] Akbar MT, Rattray, M., Powell, J.F., Meldrum, B.S. Altered expression of group I metabotropic glutamate receptor in the hippocampus of amygdale-kindled rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996;43:105-16.
- [51] Pitsch J, Schoch, S., Gueler, N., Flor, P.J., Van der Putten, H. and Becker, A.J. . Functional role of mGluR1 and mGluR4 in pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*. 2007;26:623-33.

- [52] Brown EM. Extracellular Ca^{2+} sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca^{2+} and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiological reviews*. 1991;71:371-411.
- [53] Brown EM, Gamba, G, Riccardi, D, Lombardi, M, Butters, R, Kifor, O, Sun, A, Hediger, MA, Lytton, J, Hebert, SC. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*. 1993;366(6455):577-584.
- [54] Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. 1992;258(5082):597-603.
- [55] Kaupmann K, Huggel, K, Heid, J, Flor, PJ, Bischoff, S, Mickel, SJ, McMaster, G, Angst, C, Bittiger, H, Froestl, W, Bettler, B. Expression cloning of GABAB receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*. 1997;386(6622):239-246.
- [56] Hoon MA, Adler, E, Lindemeier, J, Battey, JF, Ryba, NJ, Zuker, CS. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*. 1999;96(4):541-551.
- [57] Herrada G, Dulac, C. A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell*. 1997;90(4):763-773.
- [58] Bai M, Trivedi, S, Brown, EM. Dimerization of the extracellular calcium sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:23605-23610.
- [59] D'Souza-Li L. The calcium-sensing receptor and related diseases. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2006;50(4):628-639.
- [60] Ward DT. Calcium receptor-mediated intracellular signaling. *Cell Calcium*. 2004;35:217-228.
- [61] Awata H, Huang, C, Handlogten, ME, Miller, RT. Interaction of the calcium-sensing receptor and filamin, a potential scaffolding protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:34871-34879.
- [62] Hjälml G, MacLeod, RJ, Kifor, O, Chattopadhyay, N, Brown, EM. Filamin-A binds to the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interaction that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:34880-34887.
- [63] Hu J, Spiegel, AM. Naturally occurring mutations of the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor: implications for its structure and function. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2003;14(8):282-288.
- [64] Bouschet T, Jeremy, MH. Calcium as an extracellular signalling molecule: perspectives on the Calcium Sensing Receptor in the brain. *Comptes Rendus Biologies*. 2005;328:691-700.
- [65] D'Souza-Li L. The Calcium-Sensing Receptor and Related Diseases. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2006;50:628-639.
- [66] Ruat M, Molliver, ME, Snowman, AM, Snyder, SH. Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:3161-3165.
- [67] Brown EM, MacLeod, RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling *Physiology Review*. 2001;81:239-297.
- [68] Yano S, Brown, EM, Chattopadhyay, N. Calcium-sensing receptor in the brain. *Cell Calcium* 2004;35:257-264.

- [69] Smith SM, Bergsman, JB, Harata, NC, Scheller, RH, Tsien, RW. Recordings from single neocortical nerve terminals reveal a nonselective cation channel activated by decreases in extracellular calcium. *Neuron*. 2004;41:243-256
- [70] Rottingen J, Iversen, JG. Ruled by waves? Intracellular and intercellular calcium signaling. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2000;169:203-219.
- [71] Toescu EC, Verkhratsky, A. Parameters of calcium homeostasis in normal neuronal ageing. *Journal of Anatomy*. 2000;197:563-569.
- [72] Nelson TE, Ur, CL, Gruol, DL. Chronic interleukin-6 exposure alters electrophysiological properties and calcium signaling in developing cerebellar purkinje neurons in culture. *Journal of Neurophysiology*. 2002;88:475-486.
- [73] Spitzer NC. Electrical activity in early neuronal development. *Nature*. 2006;444:707-712.
- [74] Iino M. Identification of new functions of Ca^{2+} release from intracellular stores in central nervous system. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;369:220-224.
- [75] Mellstrom B, Savignac, M, Gomez-Villafuertes, R, Naranjo, JR. Ca^{2+} -operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models. *Physiological reviews*. 2008;88:421-449.
- [76] Rusakov DA, Fine, A. Extracellular Ca^{2+} depletion contributes to fast activity-dependent modulation of synaptic transmission in the brain. *Neuron*. 2003;37:287-297.
- [77] Gama L, Wilt, SG, Breitwieser, GE. Heterodimerization of calcium sensing receptors with metabotropic glutamate receptors in neurons. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:39053-39059.
- [78] Ferry S, Traiffort, E, Stinnakre, J, Ruat, M. Developmental and adult expression of rat calcium-sensing receptor transcripts in neurons and oligodendrocytes. *The European Journal of Neuroscience*. 2000;12:872-884.
- [79] Chattopadhyay N, Evliyaoglu, C, Heese, O, Carroll, R, Sanders, J, Black, P, Brown, EM. Regulation of secretion of PTHrP by Ca^{2+} -sensing receptor in human astrocytes, astrocytomas, and meningiomas. *American journal of physiology Cell physiology*. 2000;279:C691-699.
- [80] Chattopadhyay N, Ye, C, Yamaguchi, T, Nakai, M, Kifor, O, Vassilev, PM, Nishimura, RN, Brown, EM. The extracellular calcium-sensing receptor is expressed in rat microglia and modulates an outward K^{+} channel. *Journal of Neurochemistry*. 1999;72:1915-1922.
- [81] Chattopadhyay N, Légrádi, G, Bai, M, Kifor, O, Chianping, Y, Vassilev, PM, Brown, EM, Lechan, RM. Calcium-sensing receptor in the rat hippocampus: a developmental study. *Developmental Brain Research*. 1997;100: 13-21.
- [82] Modò G, Trobato-Salinaro, A, Barresi, V, Belluardo, N, Condorelli, DF. Identification of calcium sensing receptor (CaSR) mRNA-expressing cells in normal and injured rat brain. *Brain Research*. 2009;1298:24-36.
- [83] Kapoor A, Satishchandra, P, Ratnapriya, R, Reddy, R, Kadandale, J, Shankar, S, Anand, A. An Idiopathic Epilepsy Syndrome linked to 3q13.3-q21 and missense mutations in the extracellular calcium sensing receptor gene. *Annals of Neurology*. 2008;64:158-167.
- [84] Bernstein H-G, Baumann, B., Danos, P., Diekmann, S., Bogerts, B., Gundelfinger, E.D., Braunewell, K-H. Regional and cellular distribution of neural visinin-like protein immunoreactivities (VILIP-1 and VILIP-3) in human brain. *Journal of Neurocytology*. 1999;28:655-662.

- [85] Zozulya S, Stryer, L. Calcium-myristoyl protein switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89:11569-11573.
- [86] Spilker C, Dresbach, T., Braunewell, K-H. Reversible translocation and activity-dependent localization of the calcium-myristoyl switch protein VILIP-1 to different membrane compartments in living neurons. *Journal of Neuroscience*. 2002;22:7331-7339.
- [87] Teruel MN, Meyer, T. Translocation and reversible localization of signaling proteins: a dynamic future for signal transduction. *Cell*. 2000;103:181-184.
- [88] Lin L, Braunewell, K-H., Gundelfinger, E.D., Anand, R. Functional analysis of calcium-binding EF-hand motifs of visinin-like protein-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;296:827-832.
- [89] Dai FF, Zhang, Y., Kang, Y., Wang, Q., Gaisano, H.Y., Braunewell, K.H., Chan, C.B., Wheeler, M.B. The neuronal Ca²⁺ sensor protein visinin-like protein-1 is expressed in pancreatic islets and regulates insulin secretion. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:21942-21953.
- [90] Mahloogi H, Gonzales-Guerrico, A.M., De Cicco, R.L., Bassi, D.E., Goodrow, T., Braunewell, K.H., Klein-Szanto, A.J.P. Gradual decrease of VILIP-1 expression during mouse skin tumor progression and its role in regulating tumor cell invasive behavior. *Cancer Research*. 2003;63:4997-5004.
- [91] Lee J-M, Blennow, K., Andreasen, N., Laterza, O., Modur, V., Olander, J., Gao, F., Ohlendorf, Matt, Ladenson, J. The brain injury biomarker VLP-1 is increased in the cerebrospinal fluid of Alzheimer Disease patients. *Clinical Chemistry* 2008;54(10):1617–1623.
- [92] Braunewell K-H, Brackmann, M., Manahan-Vaughan, D. Group I mGlu receptors regulate the expression of the neuronal calcium sensor protein VILIP-1 in vivo: implications for mGlu receptor-dependent hippocampal plasticity *Neuropharmacology*. 2003;44:707-715.
- [93] Braak H, Braak, E, Yilmazer, D, Bohl J. Functional Anatomy of human hippocampal formation and related structures. *Journal of child neurology*. 1996;11:265-275.
- [94] Ramon y Cajal S. The structure of Ammon's horn. Translated by Kraft LM. Thomas, Springfield, p. 78. 1968.
- [95] Ramon y Cajal S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres*. Maloine, Paris. 1909-1911;vol I-II.
- [96] Lorente de No R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II: Continuation of the study of the Ammonic system. *J Psychol Neurol*. 1834;46(2):113-177.
- [97] Stephan H. Evolutionary trends in limbic structures. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1983;7:367-374.
- [98] Braak H. *Architectonics of the human telencephalic cortex*. Studies of Brain Function, vol 4 Springer, Berlin Heidelberg New York, p147. 1980.
- [99] Van der Bergh R, van der Schueren, G, Verresen, H, Dequeker, J. La configuration du sillon de l'hippocampe. *Bulletin de l'Association des anatomistes*. 1961;109:781-788.
- [100] Blackstad TW. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *Journal of Comparative Neurology*. 1956;105:417-538.
- [101] Lorente de No R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II: Continuation of the study of the Ammonic system. *J Psychol Neurol*. 1934;46(2):113-177.
- [102] Duvernoy HM. *The Human Hippocampus- an Atlas of Applied Anatomy*. 1988;Cap3:5-23.

- [103] Vassilev PM, Mitchel, J, Vassilev, M, Kanazirska, M, Brown, EM. Assessment of Frequency-Dependent Alterations in the Level of Extracellular Ca^{2+} in the Synaptic Cleft. *Biophysical Journal*. 1997;72:2103-2116.
- [104] Casey PJ. Protein lipidation in cell signaling. *Science*. 1995;268:221-225.
- [105] Braunewell K-H, Szanto, A.J.K. Visinin-like proteins (VSNLs): interaction partners and emerging functions in signal transduction of a subfamily of neuronal Ca^{2+} - sensor proteins. *Cell and Tissue Research*. 2009;335:301-316.
- [106] Blümcke I, Becker, AJ, Klein, C, Scheiwe, C, Lie, AA, Beck, H, Waha, A, Friedl, MG, Kuhn, R, Emson, P, Elger, C, Wiestler, OD. Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2000;59:1-10.
- [107] Sommer B, Keinänen, K, Verdoorn, TA, Wisden, W, Burnashev, N, Herb, A, Kohler, M, Takagi, T, Sakmann, B, Seeburg, PH. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels in the CNS. *Science*. 1990;249:1580–1585.
- [108] Lynd-Balta E, Pilcher,WH, Joseph, SA. Distribution of AMPA Hippocampus receptor subunits in the hippocampal formation of temporal lobe epilepsy patients. *Neuroscience*. 1996;72:15–29.
- [109] Sloviter RS. The functional organisation of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*. 1994;35:640-654.
- [110] Mathern GW, Pretorius, JK, Babb, TL. Quantified patterns of mossy fibers sprouting and neuron densities in hippocampal and lesional seizures. *Journal of Neurosurgery*. 1995;82:211–219.
- [111] Sloviter RS. Calcium binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunohistochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity *The Journal of Comparative Neurology*. 1989;280:183-196.
- [112] Kamphius W, De Rijk, TC, Talamini, LM, Lopes da Silva, FH. Hippocampal kindling induces changes in the glutamate receptor mRNA expression patterns in dentate granule neurons. *European Journal of Neuroscience*. 1994;6:1119-1127.
- [113] Ames JB, Ishima, R., Tanaka, T., Gordon, J.I., Stryer, L., Ikura, M. Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature*. 1997;389:198-202.
- [114] Spilker C, Dresbach, T., Braunewell, K-H. Reversible translocation and activity-dependent localization of the calcium-myristoyl switch protein VILIP-1 to different membrane compartments in living hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2002;17:7331-7339.

Anexos

Anexo I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do projeto: Caracterização neuropatológica da epilepsia de lobo temporal mesial familiar

Investigadores principais:

Profa. Cláudia V. Maurer Morelli, Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz, Prof. Dr. Fernando Cendes e Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com epilepsia. O objetivo geral do estudo é comparar se a lesão do tecido nervoso cerebral encontrada em pacientes com epilepsia familiar são iguais àquelas encontradas em pacientes com epilepsia na forma esporádica (sem antecedentes familiares). Esse estudo pode eventualmente melhorar o diagnóstico e levar a um melhor tratamento dessa doença. Tanto as amostras de tecido nervoso como a informação médica a meu respeito, bem como a respeito de minha família que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com epilepsia. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo, que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. O meu consentimento se refere ao uso do material que será retirado durante a cirurgia para a realização de estudos científicos. É importante lembrar que a cirurgia mencionada acima, faz parte do tratamento médico. A pesquisa laboratorial utilizando as amostras de tecido poderá ser feita durante um período máximo de 30 anos após a coleta. Após o término desta pesquisa com prazo de duração de cerca de 4 anos, pretende-se armazenar este material durante no máximo 30 anos caso haja a necessidade de se dar continuidade a pesquisas complementares. Neste caso será feito novo protocolo para submissão à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa local e se necessário ao Conselho Nacional de Ética em Saúde (CONEP).

RISCO E DESCONFORTO:

Não há quaisquer riscos ou prejuízos adicionais para os sujeitos da pesquisa, já que o material utilizado para a pesquisa (pequena amostra de tecido nervoso) será obtido de pacientes submetidos à retirada cirúrgica do tecido lesado, como forma de tratamento.

Título do projeto: Caracterização neuropatológica da epilepsia de lobo temporal mesial familiar

Investigadores principais:

Profa. Cláudia V. Maurer Morelli, Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz, Prof. Dr. Fernando Cendes e Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

Eu entendo que não terei nenhuma vantagem pessoal com a participação neste estudo e que o diagnóstico e o tratamento de possíveis familiares com a epilepsia familiar ou esporádica não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com epilepsia e suas famílias, possibilitando um melhor diagnóstico e um tratamento mais adequado. Caso, no futuro, pesquisas com o material venham a trazer resultados com algum tipo de benefício aos familiares envolvidos, estes serão prontamente informados.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos estudos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica, o que garante que os dados pessoais dos participantes não serão de livre acesso.

Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será revelado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra. Iscia Lopes Cendes, tel (019) 3788-8907 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3788-7232.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP. Eu reconheço também que a Dra. Iscia Lopes Cendes pode interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgarem apropriado.

Título do projeto: Caracterização neuropatológica da epilepsia de lobo temporal mesial familiar

Investigadores principais:

Profa. Cláudia V. Maurer Morelli, Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz, Prof. Dr. Fernando Cendes e Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

Eu _____ confirmo _____ que _____ o(a) Dr(a). _____ me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data