



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA, CCS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE A ATIVIDADE DAS
ENZIMAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL NA
AMIGDALA, HIPOCAMPO E NEOCORTEX DE PACIENTES
COM EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL MESIAL**

DOUTORADO

Marcelo Fernando Ronsoni

**Florianópolis
2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Marcelo Fernando Ronsoni

**EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE A ATIVIDADE DAS
ENZIMAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL NA
AMIGDALA, HIPOCAMPO E NEOCORTEX DE PACIENTES
COM EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL MESIAL**

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção de grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Roger Walz.

Área de Concentração:

Linha de Pesquisa:

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

RONSONI, MARCELO FERNANDO

EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL NA AMIGDALA, HIPOCAMPO E NEOCORTEX DE PACIENTES COM EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL MESIAL / MARCELO FERNANDO RONSONI ; orientador, PROF. DR. ROGER WALZ - Florianópolis, SC, 2015.

155 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. GLICOCORTICOIDES. 3. ESTRESSE. 4. MITOCÔNDRIAS. 5. HIPOCAMPO. I. WALZ, PROF. DR. ROGER. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

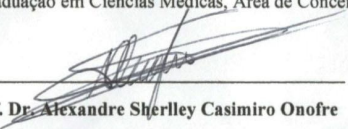
MARCELO FERNANDO RONSONI

**“EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE A ATIVIDADE DAS
ENZIMAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL NA
AMIGDALA, HIPOCAMPO E NEOCORTEX DE PACIENTES
COM EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL MESIAL”**

Esta tese foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para obtenção do título de:

DOUTOR EM CIÊNCIAS MÉDICAS

E aprovada em 28 de julho de 2015, atendendo as normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração: **Investigação Clínica.**



Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre

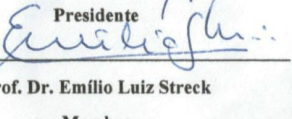
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

Presidente



Prof. Dr. Emílio Luiz Streck

Membro



Profª Drª Samira da Silva Valvassori

Membro



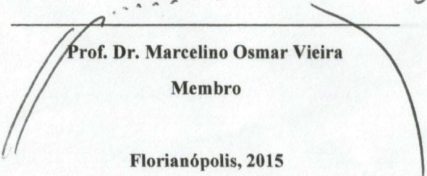
Prof. Dr. Marcelo Farina

Membro



Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre

Membro



Prof. Dr. Marcelino Osmar Vieira

Membro

Florianópolis, 2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais que nunca mediram esforços para me proporcionar uma excelente educação e o melhor núcleo familiar possível. Agradeço por me ensinar a fazer as minhas próprias escolhas, a seguir o meu caminho e a lutar pelos meus sonhos.

Ao meu irmão que sempre me incentivou a enfrentar os novos desafios, que me orientou e me ouviu nas horas mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roger Walz, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa, por permitir que eu fosse seu orientando, por dividir os seus conhecimentos, pela presença constante em todo o processo de execução desta tese, pela confiança, incentivo e auxílio. Tenho certeza que deste projeto se iniciou uma grande amizade.

Aos colegas do Serviço de Endocrinologia do HU-UFSC e funcionários da área B por todo apoio, incentivo, ensinamentos e companheirismo nesses últimos anos. Aos amigos Alexandre Hohl, Marisa Coral e Simone Lee pela amizade, apoio e incentivo em toda minha formação.

Aos amigos Mariana, Bruno e Carina e aos demais que estiveram presentes ao meu lado nos últimos anos, que entenderam muitas vezes a minha ausência e sempre incentivaram a minha formação

Aos amigos e sócios do Centro Catarinense de Endocrinologia e Metabologia, a todos colegas do grupo de pesquisas coordenado pelo Prof. Dr. Roger Walz, , aos colegas de doutorado e ao LABOX (agradecimento especial à Prof. Alexandra Latini e à Aline Remor).

Esta conquista é de todos nós!

RESUMO

Introdução: Glicocorticoides são amplamente utilizados na prática clínica. Fisiologicamente há um ritmo circadiano bem definido de secreção de cortisol e um envolvimento na resposta aguda ao estresse. Possuem também, importante papel na autopreservação e na homeostasia do sistema nervoso central. O cérebro possui alta taxa metabólica e as funções neuronais são particularmente sensíveis às disfunções mitocondriais. Há uma falta de estudos do efeito dos glicocorticoides sobre a atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (ECRM) em estruturas corticais e límbicas em humanos adultos. A atividade destas enzimas pode ser avaliada com sucesso em amostras congeladas. A cirurgia de epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso oferece uma oportunidade ética para estudar o tecido cerebral humano. Cirurgias de epilepsia são realizadas sob parâmetros hemodinâmicos e laboratoriais próximos ao fisiológico, mas não há estudos que analisaram a associação entre esses parâmetros e a atividade das enzimas envolvidas na cadeia respiratória mitocondrial. **Métodos:** Estudo de 24 indivíduos adultos com diagnóstico de epilepsia do lobo temporal mesial associado à esclerose do hipocampo (ELTM-EH) refratários ao tratamento medicamentoso. Todos foram submetidos a neurocirurgia para controle da doença e durante o ato cirúrgico foram removidas amostras do córtex temporal, da amígdala e do hipocampo. Foram obtidas a história clínica e os parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos transoperatórios. Realizada regressão linear múltipla para determinar os parâmetros intraoperatórios associados de forma independente com a atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial nas três estruturas cerebrais. Foi avaliado também, o efeito de uma dose única (10 mg endovenoso) de dexametasona sobre as enzimas dos complexos I, II, IV e sobre a atividade da succinato-desidrogenase da cadeia respiratória mitocondrial, nos mesmos tecidos, coletados até 4 horas após a infusão do corticoide. **Resultados:** A atividade das ECRM nas amostras do córtex temporal, amígdala e hipocampo foram diferentemente associadas às médias de saturação de oxigênio, hemoglobina sérica e pressão arterial média. Os intervalos de tempo da última crise convulsiva até o ato cirúrgico, do início da anestesia até a

coleta das amostras e a média de tempo de seu armazenamento em freezer também foram associadas com as atividades das ECRM. Após o controle das variáveis clínicas, demográficas, neuroradiológicas, hemodinâmicas, bioquímicas e transoperatórias dos pacientes do grupo tratado com dexametasona (n=14) e não tratado (n=10); não foi evidenciado diferenças estatisticamente significativas entre as atividades das ECRM nas amostras analisadas. **Conclusão:** O controle rigoroso dos parâmetros hemodinâmicos, bioquímicos, tempo de armazenamento das amostras, tempo desde a última crise convulsiva e tempo de anestesia são necessários para minimizar vieses confundidores em estudos com amostras cerebrais de adultos coletados em neurocirurgias eletivas. Em condições cirúrgicas estressantes, uma dose farmacológica única de dexametasona não causou mudanças significativas nas atividades das ECRM no córtex temporal, amígdala e hipocampo de pacientes com ELTM-EH. Os resultados indicam uma resistência natural ou um mecanismo rápido de adaptação das enzimas para o efeito do glicocorticoide em estruturas límbicas e neocorticais destes pacientes. O desenho do estudo não é capaz de concluir sobre o efeito da atividade das ECRM na epileptogênese e ictogênese da ELTM-EH. Os nossos resultados são relevantes para entendermos a função mitocondrial cerebral durante estados de estresse agudo em pessoas saudáveis e em pacientes com doenças neuropsiquiátricas.

Palavras-chave: Glicocorticoides. Estresse. Mitocôndrias. Amígdala. Hipocampo.

ABSTRACT

Background: Glucocorticoids are widely used in clinical practice. Physiologically there is a clear circadian rhythm of cortisol secretion and involvement in the acute stress response. It also has an important role in self-preservation and the homeostasis of the central nervous system. The brain has a high metabolic rate and neuronal functions are particularly sensitive to mitochondrial dysfunction. There is a lack of studies of the effect of corticosteroids on the mitochondrial respiratory chain enzymes (MRCE) in cortical and limbic structures in adult humans. The activity of these enzymes can be successfully evaluated in frozen samples. The epilepsy surgery to drug refractory treatment offers an ethical opportunity to study human brain tissue. Epilepsy surgeries are performed under hemodynamic and laboratory parameters close to normal but there are no studies that examined the association between these parameters and the activity of enzymes involved in mitochondrial respiratory chain.

Methods: Study of 24 adults with diagnosis of mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampus sclerosis (MTLE-HS) refractory to drug treatment. All patients underwent neurosurgery for disease control and during surgery samples were removed from the temporal cortex, the amygdala and the hippocampus. They were obtained medical history and biochemical and intraoperative hemodynamic parameters. Performed multiple linear regression to determine the intraoperative parameters independently associated with the activity of MRCE in three brain structures. Also evaluated the effect of a single dose (10 mg intravenously) dexamethasone on enzymes complexes I, II and IV and the succinate dehydrogenase activity of mitochondrial respiratory chain, in the same samples, collected up to 4 hours after administration the corticosteroids. **Results:** The activity of MRCE in samples of temporal cortex, amygdala and hippocampus were associated differently the average oxygen saturation, serum hemoglobin and mean arterial pressure. The time intervals of the last convulsive crisis to the surgery, the beginning of anesthesia to the collection of samples and the average time of their storage in freezer were also associated with the activities of MRCE. After controlling for clinical, demographic, neuroradiological, hemodynamic, biochemical and transoperative

parameters, patients in the group treated with dexamethasone (n=14) and untreated (n= 11) was not evidenced significant differences between the activities of the MRCE samples. **Conclusion:** Careful control of hemodynamic parameters, biochemical, storage time of the samples, time since last seizure and anesthetic time are needed to minimize confounding biases in studies of brain samples of adults collected in elective neurosurgery. In stressful surgical conditions, a single pharmacological dose of dexamethasone did not cause significant changes in activities of the MRCE in the temporal cortex, amygdala and hippocampus of patients with MTLE-EH. The results indicate a natural resistance or a quick adjustment mechanism for enzymes to the effect of glucocorticoids on limbic and neocortical structures of these patients. The study design is unable to conclude on the effect of the activity of MRCE in epileptogenesis and ictogenesis the MTLE-EH. Our results are relevant for understanding the brain mitochondrial function during acute stress states in healthy people and in patients with neuropsychiatric diseases.

Key words: Glucocorticoids. Stress. Mitochondria. Amygdala. Hippocampus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do cortisol, cortisona, e dos glicocorticoides sintéticos mais comuns, incluindo a dexametasona	20
Figura 2 - Vias de síntese dos esteroides adrenais.....	21
Figura 3 - Anatomia, bioquímica da mitocôndria (A) e proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (B)	27
Figura 4 - Fluxograma de inclusão dos pacientes na análise dos resultados	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Variáveis clínicas, demográficas, neurorradiológicas, neurocirúrgicas, laboratoriais e hemodinâmicas de pacientes com ELTM-EH resistentes a medicamentos orais.....	49
Tabela 2 - Associação entre os parâmetros hemodinâmicos e laboratoriais e a respiração mitocondrial de amostras do córtex temporal médio coletadas de pacientes com ELTM-EH resistentes a medicamentos orais.....	53
Tabela 3 - Associação entre os parâmetros hemodinâmicos e laboratoriais e a respiração mitocondrial de amostras da amígdala coletadas de pacientes com ELTM-EH resistentes a medicamentos orais	57
Tabela 4 - Associação entre os parâmetros hemodinâmicos e laboratoriais e a respiração mitocondrial de amostras da cabeça do hipocampo coletadas de pacientes com ELTM-EH resistentes a medicamentos orais.....	62
Tabela 5 - Modelo preditivo de regressão linear múltipla para cada enzima da cadeia respiratória mitocondrial em amostras do córtex temporal médio, amígdala e cabeça do hipocampo ...	67
Tabela 6 - Variáveis clínicas, demográficas, neurorradiológicas e neurofisiológicas dos pacientes com ELTM-EH submetidos à cirurgia de acordo com o uso de dexametasona	72
Tabela 7 - Parâmetros hemodinâmicos, hematológicos, bioquímicos, gasométricos, parâmetros transoperatórios, neuroquímicos e tempo de armazenamento de amostras dos pacientes com ELTM-EH submetidos à cirurgia de acordo com o uso de dexametasona	78
Tabela 8 - Atividade dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial, GFAP e GluR1 nos diferentes tecidos cerebrais dos pacientes com ELTM-EH submetidos à cirurgia de acordo com o uso de dexametasona	81
Tabela 9 - Análise univariada da associação entre a frequência de crises convulsivas mensais e os parâmetros da respiração mitocondrial na amígdala, hipocampo e córtex temporal de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo resistentes a medicações orais.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	– Hormônio Adrenocorticotrófico
ANOVA	– Análise de Variância
AVP	– Arginina Vasopressina
ATP	– Adenosina trifosfato
BZP	– Benzodiazepínico
CAM	– Concentração Alveolar Mínima
CCS	– Centro de Ciências da Saúde
CEPESC	– Centro de Epilepsia de Santa Catarina
CNS	– Conselho Nacional de Saúde
CR	– Cadeia Respiratória
CRH	– Hormônio Liberador de Corticotrofina
DAE	– Drogas Antiepiléticas
DCIP	– Succinato-2,6-dicloroindófenol
DEXA	– Dexametasona
DNA	– Ácido Desoxirribonucleico
DSM-IV	– Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4. ed.
ECRM	– Enzimas da Cadeia Respiratória Mitocondrial
EEG	– Eletroencefalograma
EH	– Esclerose do Hipocampo
ELTM-EH	– Epilepsia de Lobo Temporal Mesial associada à Esclerose do Hipocampo
EV	– Endovenoso
FDG-PET	– Tomografia por emissão de pósitrons com [18F] Fluorodeoxyglucose
FMN	– Flavina Mononucleotídeo
GluR1	– <i>Glutamate Receptor sub-unit 1</i>
GFAP	– <i>Immunecontent of Glial Ácid Fibrilar Protein</i>
HHA	– Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HU	– Hospital Universitário
I.V.	– Intravenoso
MTLE	– <i>Mesial Temporal Lobe Epilepsy</i>
pH	– Potencial de Hidrogênio
pCO₂	– Pressão Parcial de Gás Carbônico
pO₂	– Pressão de Oxigênio

PTP	– Poros de Transição de Permeabilidade
QOLIE31	– <i>Quality of Life in Epilepsy Inventory-31</i>
RG	– Receptor de Glicocorticoide
RM	– Receptor de Mineralocorticoide
RNA_m	– Ácido ribonucleico Mensageiro
SDH	– Succinato-Desidrogenase
SNC	– Sistema Nervoso Central
SPSS	– Statistical Package for the Social Sciences
TBS	– Solução Salina Tamponada com Tris
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFSC	– Universidade Federal de Santa Catarina
VO	– Via Oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 GLICOCORTICOIDES E O EIXO HIPOTÁLAMO- HIPÓFISE-ADRENAL (HHA)	19
1.1.1 Glicocorticoides exógenos	23
1.2 SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) E GLICOCORTICOIDES	24
1.3 MITOCÔNDRIA, CADEIA RESPIRATÓRIA E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA	26
1.4 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL ASSOCIADA À ESCLEROSE DO HIPOCAMPO (ELTM-EH)	30
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.1.1 Objetivos específicos	33
3 JUSTIFICATIVA	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 PACIENTES	37
4.1.1 Critérios de inclusão	38
4.1.2 Critérios de exclusão	39
4.2 VARIÁVEIS CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS	39
4.3 PROTOCOLO DE ANESTESIA E TRATAMENTO COM DEXAMETASONA	40
4.4 VARIÁVEIS CIRÚRGICAS E AMOSTRA DE TECIDO CEREBRAL TRANSOPERATÓRIO	41
4.5 PREPARAÇÃO TECIDUAL E HOMOGENEIZAÇÃO	42
4.6 ATIVIDADES DOS COMPLEXOS DE CADEIA RESPIRATÓRIA	42
4.7 WESTERN BLOT	43
4.7.1 Produtos químicos para a Western Blot	43
4.7.2 Análise de Western Blot	43
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4.9 ASPECTOS ÉTICOS	45
5 RESULTADOS	47
5.1 CAPÍTULO I - Atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em tecido cerebral humano congelado: implicações metodológicas da coleta e armazenamento das amostras	47

5.2 CAPÍTULO II - Efeito de uma dose única de dexametasona sobre a atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial do córtex, amígdala e hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo	71
5.3 CAPÍTULO III - Associação entre a frequência de crises epiléticas e a atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória em estruturas do lobo temporal de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo	83
6 DISCUSSÃO	85
6.1 CAPÍTULO I - Atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em tecido cerebral humano congelado: Implicações metodológicas da coleta e armazenamento das amostras	85
6.2 CAPÍTULO II - Efeito de uma dose única de dexametasona sobre a atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial do córtex, amígdala e hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo	88
6.3 CAPÍTULO III - Associação entre a frequência de crises epiléticas e a atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória em estruturas do lobo temporal de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo	90
7 CONCLUSÃO	93
9 REFERENCIAS	95
APÊNDICE A- Instrumento de Coleta	107
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	109
ANEXO A – Escala QOLIE31	113
ANEXO B – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa	117
ANEXO C – Artigo: Neuropsychiatric Disease and Treatment	118
ANEXO D – Artigo 2: Journal of Neuroscience Methods	129
ANEXO E - Produção Científica Durante Período do Doutorado	153

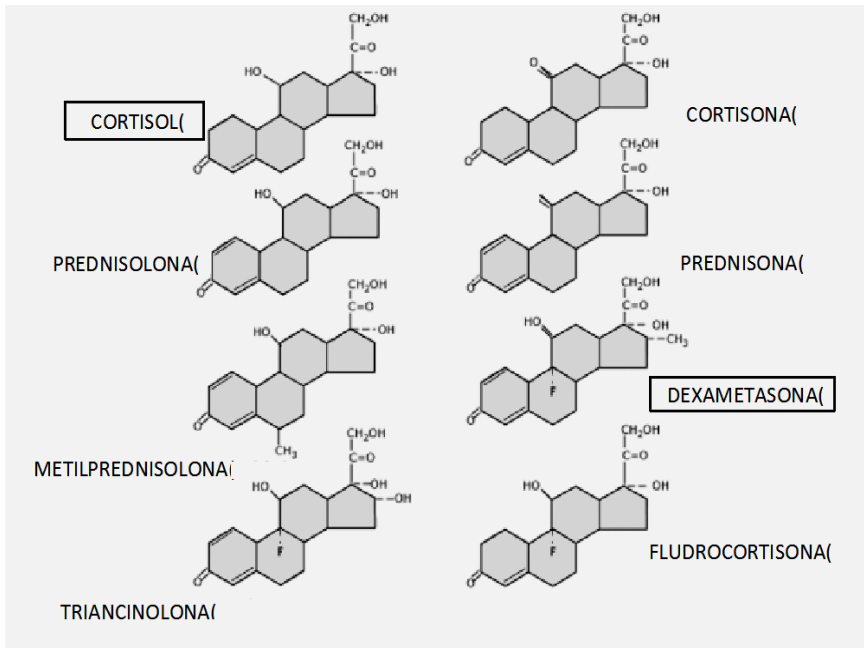
1 INTRODUÇÃO

1.1 GLICOCORTICOIDES E O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HHA)

O hipotálamo pode ser considerado o centro de coordenação do sistema endócrino. Ele consolida sinais derivados de estímulos corticais superiores, função autonômica, estímulos ambientais como a luz e temperatura e *feedback* endócrino periférico. Por sua vez, o hipotálamo proporciona sinais precisos para a glândula hipófise que, em seguida, libera hormônios que influenciam os sistemas endócrinos no corpo. Especificamente, o eixo hipotálamo-hipófise afeta diretamente as funções da glândula tireoide, da glândula adrenal e das gônadas, bem como influencia no crescimento, na produção de leite e no balanço hídrico (Charmandari et al, 2005).

Os corticoides são hormônios esteroides, cujo precursor é o colesterol. Tanto o colesterol como os esteroides adrenais têm em comum o núcleo ciclopentanoperidrofenantreno, formado por três anéis de seis carbonos e um anel de cinco carbonos (Buckley et al, 2005). Os esteroides naturais possuem dois grupos metil nas posições 10 e 13. Os esteroides com 21 carbonos em sua molécula, com uma cadeia lateral de dois carbonos na posição 17, são classificados como glicocorticoides e mineralocorticoides (figura 1).

Figura 1 - Estrutura química do cortisol, cortisona, e dos glicocorticoides sintéticos mais comuns, incluindo a dexametasona



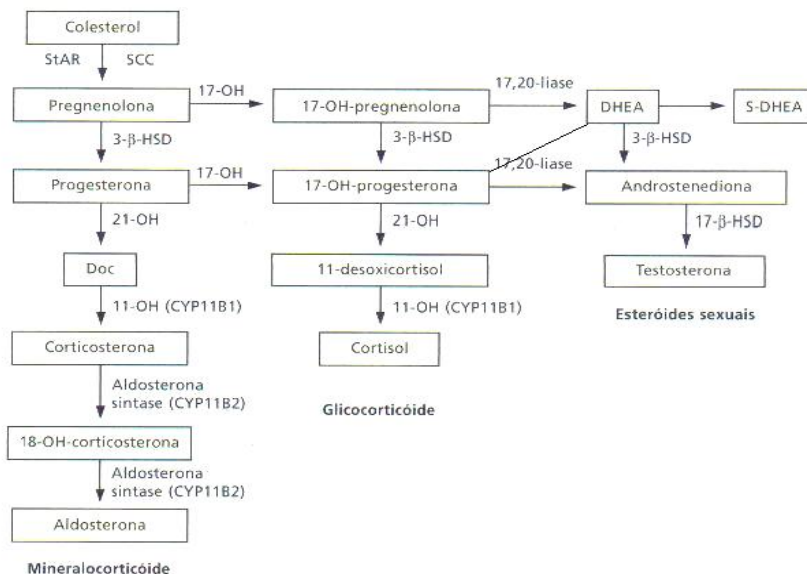
Fonte: Adaptado de Kronenberg et al (2010).

A secreção do eixo HHA apresenta um ritmo circadiano, relacionado ao ciclo sono-vigília. De acordo com esse ritmo, as menores concentrações plasmáticas de cortisol ocorrem por volta da meia noite. Após 2 a 3 horas do início do sono, os níveis de cortisol começam a aumentar, apresentando o pico secretório no horário de despertar (ou um pouco antes do mesmo). Ao longo do dia, há um declínio gradual da concentração do cortisol. Embora o mecanismo desse padrão circadiano de secreção não esteja suficientemente esclarecido, sabe-se que é controlado por conexões entre os núcleos para-ventriculares e supra-quiasmáticos do hipotálamo (Buckley et al, 2005; Bornstein et al, 1999).

A maioria das reações envolvidas na síntese dos hormônios esteroides é catalisada por enzimas do citocromo P450, localizadas nas membranas do retículo endoplasmático

liso e das mitocôndrias (Bornstein et al, 1999). Os principais passos da síntese de esteroides adrenais é mostrado na figura 2.

Figura 2 - Vias de síntese dos esteroides adrenais



Fonte: Adaptado de Kronenberg et al (2010).

Por serem lipofílicos, os glicocorticóides atravessam a membrana celular por um processo passivo e se ligam a receptores intracelulares específicos, encontrados em praticamente todos os tecidos do organismo. Diferentemente de outros hormônios esteroides, cujos receptores são nucleares, os receptores para os glicocorticóides encontram-se no citoplasma, formando complexos inativos com proteínas de choque térmico (hsp90, hsp70, hsp56 – *heat shock proteins*), com uma proteína de baixo peso molecular (p23) e com imunofilinas. A ligação do hormônio ao receptor promove uma alteração conformacional na porção central do receptor, deslocando essas proteínas e ativando-o (Hayashi et al, 2004).

A interação direta dos receptores de glicocorticóides com o DNA, ou indireta, via fatores de transcrição, é conhecida como

ação genômica dos glicocorticoides. Entretanto, a ação genômica não explica vários efeitos rápidos desses hormônios. Há evidências de que os glicocorticoides apresentem ações rápidas não-genômicas mediadas por receptores de membranas acoplados às proteínas G estimulatórias ou inibitórias, com consequente ativação ou inibição da formação de segundos mensageiros. Alguns pesquisadores indicam a possibilidade dessas ações não-genômicas serem mediadas por receptores clássicos intracelulares associados aos receptores de membrana (Charmandari et al, 2005; Santos et al, 2005).

Os glicocorticoides possuem importantes ações no metabolismo de carboidratos e proteínas, no sistema nervoso central (SNC), no tecido ósseo, no músculo e no sistema renal. Possuem ações no metabolismo das gorduras e na reatividade vascular, aumentam a resistência ao estresse e modulam as respostas imunológicas e inflamatórias (Charmandari et al, 2005).

O cortisol é o glicocorticoide encontrado em maior quantidade no nosso organismo. Na circulação, ele está em equilíbrio com a cortisona, um análogo inativo, devido a ação das enzimas 11- β -hidroxiesteroide-desidrogenase (11 β -HSD). A cortisona circula como um pró-hormônio do cortisol. Nos tecidos alvos, na existência de receptores de cortisol, a cortisona é transformada em cortisol pela 11 β -HSD tipo 1 (Santos et al, 2005; Williams, 2005).

Nos tecidos onde há a prevalência de receptores de aldosterona (outro glicocorticoide proveniente da mesma rota metabólica a partir do colesterol – ver figura 2), ocorre a conversão reversa do cortisol a cortisona pela 11 β -HSD tipo 2, ocorrendo, assim, a remoção do cortisol da competição pelos receptores de aldosterona, os quais tem alta afinidade por cortisol (Santos et al, 2005; Williams, 2005). Entretanto, alguns tecidos não expressam a enzima 11 β -HSD tipo 2 (por deficiência congênita ou inibida). Desta forma, o cortisol alcança os receptores de mineralocorticoides (de aldosterona) destes tecidos e interage com eles (Santos et al, 2005; Williams, 2005).

O estresse físico ou psicológico agudo ativa o eixo HHA e o sistema nervoso simpático. Situações que representam ameaça à homeostase orgânica, como hipoglicemia, traumas, infecções, calor ou frio intensos, além de situações de estresse em geral, estimulam a síntese e secreção do hormônio

adrenocorticotrófico (ACTH) e do cortisol. O estresse exerce seus efeitos através da estimulação do hipotálamo para liberar indutores do ACTH, com hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina vasopressina (AVP) (Antoni, 1986; Aguilera 1994).

Durante a reação de estresse, todas as ações dos glicocorticoides ocorrem em proporção às suas concentrações plasmáticas. Os efeitos do estresse podem se manifestar em quadro domínios distintos: fisiológico, comportamental, experiência subjetiva e função cognitiva. Os efeitos fisiológicos incluem alterações no SNC e nos sistemas neuroendócrino, neurovegetativo e imunológico que afetam os demais sistemas. O estresse promove alterações importantes para a autopreservação do indivíduo e modula áreas do cérebro envolvidas com o humor e com a cognição (Rodrigues et al, 2005).

O processo cirúrgico é um dos mais potentes ativadores do eixo HHA. O grau de ativação do eixo depende tanto do tipo de cirurgia quanto dos agentes anestésicos usados durante o procedimento. As concentrações plasmáticas de ACTH aumentam na momento da incisão e durante a cirurgia mas a maior secreção de ACTH e cortisol ocorre durante a reversão da anestesia, extubação e no período de pós-operatório imediato, principalmente em resposta à dor (Williams, 2005).

Há uma variação considerável no aumento da secreção de cortisol em indivíduos submetidos à cirurgia. Esta variabilidade é, em parte devido ao uso concomitante de medicamentos, idade e comorbidades. No entanto, em geral, a secreção de cortisol é proporcional ao grau de estresse cirúrgico (Lamberts, 1997).

1.1.1 Glicocorticoides exógenos

Os glicocorticoides são os medicamentos com ação imunossupressora e anti-inflamatória mais prescritos em todo o mundo (Judd et al, 2014). Eles mimetizam os efeitos fisiológicos dos ligantes endógenos sobre os receptores de mineralocorticoides (RM) e os receptores de glicocorticoides (RG) (ter Heegde et al, 2015).

A meia vida dos glicocorticoides sintéticos são geralmente mais longas do que a do cortisol endógeno, variando em aproximadamente de uma hora para a prednisolona a mais de

quatro horas para a dexametasona. Os glicocorticoides exógenos estão sujeitos à mesma redução, oxidação, hidroxilação, e reações de conjugação que os endógenos (Guengerich, 1999).

Os medicamentos dexametasona, fludrocortisona, betametasona (que são fluorados na posição 6-alfa ou 9-alfa), metilprednisolona (metilado na posição 6-alfa) ou deflazacort (metilado na posição 16,17) estão protegidos contra a inativação da 11 β -HSD2, aumentando assim, a sua disponibilidade local (Diederich et al, 2012). Eles também, não se ligam às globulinas de ligação de corticosteroides e não são suscetíveis a regulação dos níveis disponíveis (Kadmiel et al, 2013).

A dexametasona tem uma elevada atividade glicocorticoide e pouca atividade mineralocorticoide. É um agente anti-inflamatório e imunossupressor altamente potente e amplamente utilizada na prática clínica (Schimmer et al, 2001).

1.2 SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) E GLICOCORTICOIDES

Os glicocorticoides desempenham um papel importante na função e homeostasia do sistema nervoso central. Influenciam a excitabilidade neuronal, o comportamento, a formação da memória e a neurodegeneração (Bordeau et al, 2005).

Os receptores para glicocorticoides estão presentes em várias regiões do SNC, principalmente no sistema límbico e no hipocampo. Estas regiões apresentam altas concentrações de glicocorticoides e estão envolvidas com a resposta ao estresse, com o humor, com a aprendizagem e com a memória (Bordeau et al, 2005).

Os níveis normais a moderadamente elevados de glicocorticoides aumentam a plasticidade sináptica e facilitam a cognição dependente do hipocampo, a aprendizagem e os processos de memória, atuam sobre o humor e a modulação dos padrões de sono (Chen et al, 2013).

Em contraste, os níveis cronicamente elevados podem prejudicar a plasticidade sináptica e a cognição, diminuir a neurogênese e causar atrofia dendrítica (McEwen et al, 2001). O estresse prolongado e crônico pode ser prejudicial tanto ao hipocampo, quanto à amígdala e ao córtex pré-frontal (McEwen et al, 2012; Lupien et al, 2007). As altas concentrações hormonais podem levar a déficits na atenção, no processamento

visual-espacial, na memória, na resposta condicional, no raciocínio e na fluência verbal (Grillon et al, 2004; Mahei et al, 2008). O déficit parece ser principalmente na recuperação de informações, em vez de na sua aquisição (Jameison et al, 2001).

Em nível celular, os corticoides exercem diversas ações sobre o SNC. Eles penetram o cérebro e se ligam aos dois tipos de receptores intracelulares: glicocorticoides (expressos em neurônios cerebrais e células da glia) e mineralocorticoides (expressos principalmente em áreas do sistema límbico, tal como o hipocampo). O cortisol se liga com uma afinidade 10 vezes mais elevada no RM do que no RG (Berardeli et al, 2013).

Níveis de cortisol basal ocupam os receptores de elevada afinidade (mineralocorticoides), enquanto que os receptores de glicocorticoides são ativados quando as concentrações de corticoides se elevam, como durante o período ativo do ritmo circadiano, no estresse ou nas doenças de excesso de glicocorticoides (Berardeli et al, 2013; De Kloet et al, 1998).

Nas células do hipocampo e outras estruturas límbicas, apenas 11 β -HSD1 é expressada (Vodicka et al, 2014). Estes dados são corroborados em estudos com ratos *knock-out* para 11 β -HSD1 onde o *feedback* do glicocorticoide é atenuado sobre o eixo HHA e há uma resposta sistêmica exagerada ao esteroide (Harris et al, 2001). Estes resultados indicam um potencial papel da 11 β -HSD1 em alterações induzidas pelo estresse. No entanto, estudos prévios em ratos que investigaram o efeito do estresse e glicocorticoides sobre 11 β -HSD1 foram incompletos e contraditórios (Monder et al, 1994; Low et al, 1994; Jameson et al, 1997; Pelletier et al, 2007). Como a 11 β -HSD2 não é expressa, ocorre a ativação do RM por glicocorticoides nestas áreas cerebrais (Holmes et al, 2003; Rajan et al, 1996).

Estudos clínicos mostram que em ratos, a 11 β -HSD1 está envolvida no declínio relacionado com a idade, em tarefas de aprendizagem e memória. Roedores sem a enzima parecem estar protegidos contra o declínio da função cerebral observadas no envelhecimento. Em humanos, não é conhecido o impacto da modulação da 11 β -HSD1 (Seckl et al, 2004).

O tratamento farmacológico com glicocorticoides pode causar distúrbios psicológicos e cognitivos clinicamente significativos. Os mecanismos são provavelmente multifatoriais, incluindo a predisposição individual para as respostas adaptativas celular e cerebral (Judd et al, 2014).

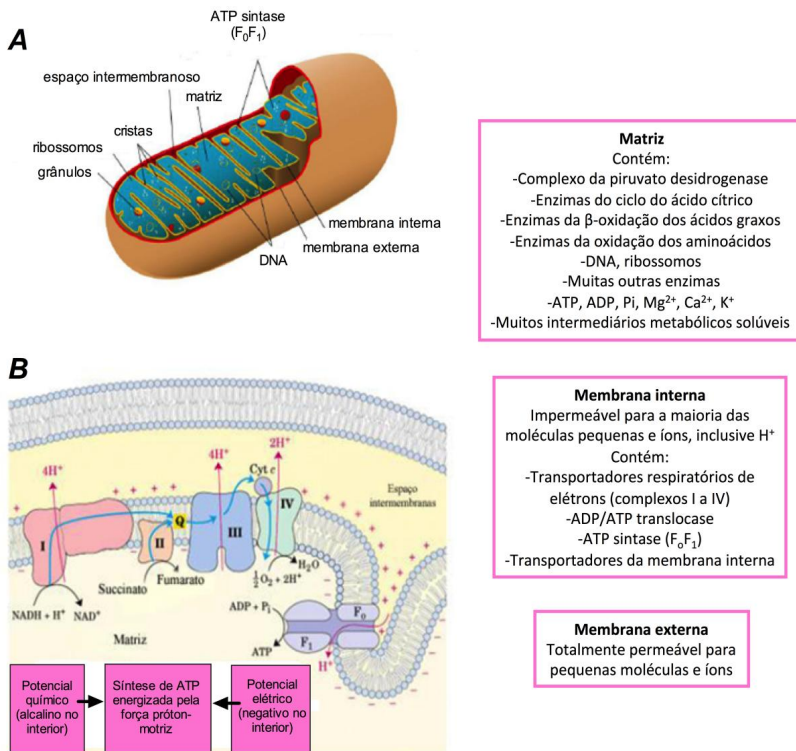
Alterações na adaptação ao estresse têm sido relacionadas com a fisiopatologia dos transtornos de humor, incluindo a ansiedade e a depressão (Rodrigues et al, 2009; McEwen et al, 2012). Há evidências de hiperatividade do eixo HHA em pacientes com transtornos de humor, particularmente em pacientes com transtorno depressivo maior agudo (Watson et al, 2002). O transtorno depressivo maior pode ser considerado, pelo menos em parte, como uma desregulação da resposta ao stress (Young et al, 2000).

1.3 MITOCÔNDRIA, CADEIA RESPIRATÓRIA E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

A mitocôndria é uma organela celular responsável pela maior obtenção líquida de energia, a qual contém proteínas envolvidas com a oxidação de nutrientes bem como com a respiração celular com concomitante geração de energia (Lehninger e Smith, 1949; Kennedy e Lehninger, 1950). Esta organela possui uma estrutura basicamente membranosa, sendo envolvida por duas membranas, a membrana externa e a membrana interna, ambas com composição química e estrutural diferentes entre si.

A membrana externa é mais permeável que a membrana interna. O espaço entre estas membranas é denominado espaço intermembrana, onde ocorrem reações essenciais ao metabolismo celular. A membrana interna é formada por pregas que se expandem no espaço intramitocondrial (matriz mitocondrial) denominadas cristas mitocondriais (Nelson e Cox, 2004) (Figura 3).

Figura 3 - Anatomia, bioquímica da mitocôndria (A) e proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (B)



Fonte: Adaptado de Lehninger et al (2004)

A maquinaria molecular desta organela compreende enzimas presentes na matriz mitocondrial (ciclo de Krebs) e proteínas organizadas na membrana mitocondrial interna (cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória). Os genomas nuclear e mitocondrial são responsáveis por codificar os complexos proteicos envolvidos na geração de energia e respiração celular (Di Donato, 2000).

A cadeia respiratória (CR) é composta por cinco complexos enzimáticos multiproteicos distribuídos de forma especial na membrana mitocondrial interna. Os elétrons oriundos do NADH e do $FADH_2$ vindos do ciclo de Krebs e de outras reações catalisadas por desidrogenases são transferidos para a CR,

tendo o oxigênio molecular como acceptor final. Junto a este processo, ocorre a translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna e a síntese endergônica de ATP, empregando como força motriz a energia armazenada como gradiente eletroquímico de prótons (Babcock e Wikstrom, 1992; Voet e Voet, 1995). A maior parte das proteínas que constituem cada complexo se encontram embebidas na membrana mitocondrial interna, possuindo vários grupamentos prostéticos com potencial de oxi-redução sucessivamente maiores (Voet e Voet, 1995; Di Donato, 2000).

Os elétrons que provém principalmente da glicólise e do ciclo de Krebs são doados através do NADH e entram pelo complexo I (NADH – Coenzima Q redutase), o qual transfere estes elétrons para a coenzima Q (CoQ), também chamada de ubiquinona. Este complexo é o maior componente proteico presente na membrana mitocondrial interna e é formado por sete unidades codificadas pelo DNA mitocondrial e pelo menos por 34 subunidades codificadas pelo DNA nuclear (Voet e Voet, 1995; Di Donato, 2000; Sivitz e Yorek, 2010). O Complexo I possui uma molécula de flavina mononucleotídeo (FMN) como grupamento prostético e de seis a sete centros ferro-enxofre, os quais participam da transferência de elétrons. O NADH transfere dois elétrons, e a FMN e CoQ são capazes de aceitar um ou dois elétrons de cada vez, pois suas formas semiquinonas são estáveis.

O complexo II (Succinato – Coenzima Q redutase) é composto por quatro subunidades proteicas, dentre elas a enzima dimérica succinato-desidrogenase, componente do ciclo de Krebs, todas codificadas pelo DNA nuclear. Neste complexo, os elétrons provindos do FADH₂ são doados para a CoQ. Estão presentes um FAD covalentemente ligado à succinato-desidrogenase, dois centros ferro-enxofre e um citocromo *b560* (Voet e Voet, 1995; Di Donato, 2000).

Os elétrons provindos da CoQ são transferidos para o carreador móvel de elétrons, o citocromo *c* através do Complexo III (Coenzima Q – Citocromo *c* redutase). Este complexo está arranjado assimetricamente na membrana mitocondrial interna contendo 11 subunidades, onde três delas contém centros redox utilizados na geração de energia. Estas três unidades chaves estão representadas pelo citocromo *b*, único codificado pelo

genoma mitocondrial, um centro ferro-enxofre e o citocromo *c*₁ (Saraste, 1990).

O Complexo IV (Citocromo *c* oxidase) transporta elétrons doados pelo ferrocitocromo *c* para o oxigênio molecular. Este complexo consiste de doze ou mais subunidades polipeptídicas (Barrientos et al., 2002). O centro catalítico da enzima é formado por três subunidades maiores e são codificadas pelo DNA mitocondrial. A subunidade I contém grupamentos heme e um dos íons Cu (Cu_B), e a subunidade II contém um centro de Cu binuclear (Cu_A) (Capaldi, 1990). A subunidade III não apresenta grupamento prostético e não parece estar envolvida na síntese de ATP, apenas favorece a estabilidade estrutural. As demais subunidades, codificadas pelo DNA nuclear, não parecem ser essenciais ao mecanismo catalítico básico de redução de oxigênio e à transferência vetorial de prótons (Saraste, 1990; Barrientos et al., 2002). A reação redox entre o citocromo *c* e o oxigênio molecular é irreversível, sendo a citocromo *c* oxidase uma enzima chave na produção de energia (Poyton e McEwen, 1996).

O complexo V ou ATP-sintase é responsável pela síntese de ATP, sendo formado por duas subunidades codificadas pelo DNA mitocondrial (ATPase 6 e 8) e pelo menos por doze subunidades codificadas pelo DNA nuclear. É formado por um componente catalítico solúvel localizado na matriz mitocondrial (F₁-ATPase) e um componente de membrana hidrofóbico (F₀-ATPase) o qual contém um canal de prótons (Saraste, 1990).

Os complexos trans-membrana I, III e IV, além de participar da transferência de elétrons na cadeia respiratória, possuem a capacidade de bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, formando um gradiente eletroquímico. Este gradiente determina uma polarização da membrana mitocondrial interna, que pode ser revertida pelo fluxo desses prótons através do componente F₀ da ATP-sintase. O fluxo de prótons leva à condensação do ADP e de fosfato inorgânico em ATP (Saraste, 1990; Wallace, 1999). A ATP-sintase é uma enzima funcionalmente reversível que pode catalisar tanto a síntese quanto a hidrólise de ATP (Saraste, 1990).

O cérebro tem uma alta taxa metabólica e as funções neuronais são particularmente sensíveis a qualquer disfunção mitocondrial (Batandier et al, 2014). As mitocôndrias possuem a

função conhecida de geração de energia através do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa. No entanto, sabe-se que as mitocôndrias desempenham papéis importantes adicionais na regulação do cálcio intracelular, na citoproteção e na plasticidade neural. Assim, a função mitocondrial desempenha um papel importante tanto a curto prazo na função sináptica, bem como a longo prazo, na plasticidade estrutural. Ambas as funções (sináptica e plasticidade) são conhecidas por serem reguladas também pelos glicocorticoides (Du et al, 2009).

Em ratos adultos, a dexametasona pode influenciar significativamente o metabolismo oxidativo energético das mitocôndrias do cérebro por inibir as taxas de respiração, desacoplar o segundo e terceiro local de fosforilação, reduzir os teores de citocromo e atividades ATPase (Pandya et al, 2007). Em níveis fisiológicos, receptores de glicocorticoides translocam a mitocôndria e reduzem os danos potencialmente prejudiciais de estresse oxidativo. Em níveis elevados, este mecanismo falha depois de algumas horas e há aumento da neurotoxicidade (Du et al, 2009).

Tem surgido hipóteses da relação das mitocôndrias e do estresse oxidativo nas epilepsias adquiridas, tais como epilepsia do lobo temporal. Os mecanismos pelos quais a lesão inicial induz epilepsia crônica, conhecida como epileptogênese, envolve várias alterações celulares, moleculares e fisiológicas, que resultam em circuitos de hiperexcitabilidade. Entretanto, a contribuição dos mecanismos mitocondriais e redox para a epileptogênese continua incerto.

1.4 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL ASSOCIADA À ESCLEROSE DO HIPOCAMPO (ELTM-EH)

A epilepsia do lobo temporal associada à esclerose do hipocampo (ELTM-EH) é uma síndrome específica, com características clínicas bem definidas de neuroimagem, achados anatomopatológicos, semiológicos e eletrofisiológicos (Wieser et al, 2004). A ELTM-EH tem uma história e um quadro clínico relativamente estereotipado, sendo frequente a ocorrência de um episódio precipitante inicial na primeira infância (crise febril prolongada, infecção do SNC, estado de mal epiléptico) seguido de um período silente de vários anos e de crises parciais com comprometimento da consciência iniciando na segunda década

de vida. Os pacientes apresentam prejuízo cognitivo envolvendo principalmente a memória episódica, havendo também alterações de linguagem, de funções executivas e de memória semântica (Castro e Adda, 2012).

Cerca de 40% das epilepsias são de lobo temporal, e 2/3 desta população apresentam crises intratáveis com antiepiléticos orais, havendo indicação cirúrgica (Blair et al, 2012). Pacientes com ELTM tem suas crises epiléticas originadas nas estruturas mesiais do lobo temporal: hipocampo, amígdala ou giro hipocampal e geralmente ocorrem associadas à esclerose do hipocampo. Porém, outras lesões como malformações vasculares, tumores, displasias corticais da região mesial temporal também podem acarretar sinais e sintomas semelhantes (Bustamante e Sakamoto, 1999).

A epilepsia refratária é definida na prática clínica pela falha no controle das crises epiléticas após o uso de dois fármacos epiléticos em doses adequadas. Estudos demonstram que pacientes com epilepsia refratária podem apresentar prejuízos significativamente maiores do ponto de vista neuropsicológico, psiquiátrico e social, os quais podem não só reduzir a qualidade de vida, como até mesmo, diminuir a expectativa de vida devido ao risco de morte súbita (French et al, 2007).

Na ELTM-EH menos de 20% dos pacientes ficam livres de crises com tratamento farmacológico, e cerca de 70% dos casos refratários evoluem satisfatoriamente com intervenção cirúrgica. A ELTM-EH é a forma mais comum da síndrome epilética remediável cirurgicamente (Engel et al, 1996). O procedimento cirúrgico mais comum é a ressecção de parte do córtex temporal anterior, do hipocampo, e de parte da amígdala (Josephson et al, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a modulação das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial após a administração de dose única de dexametasona, em tecido cerebral humano (amígdala, hipocampo e córtex temporal) de pacientes com ELTM-EH submetidos à cirurgia para tratamento da epilepsia refratária.

2.1.1 Objetivos específicos

- a) Mensurar a atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial em tecidos humanos (amígdala, hipocampo e córtex temporal) de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo que receberam ou não uma dose única de dexametasona no pré operatório de cirurgia para tratamento da epilepsia refratária;
- b) Avaliar a associação independente entre diversas variáveis clínicas, hemodinâmicas e laboratoriais com as enzimas mitocondriais de amostras de tecidos humanos (amígdala, hipocampo e córtex temporal) de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo que foram submetidos a cirurgia para tratamento da epilepsia refratária;
- c) Identificar variáveis que devem ser controladas em estudos desta natureza para evitar vieses de confusão relacionados à distribuição de variáveis transoperatórias sobre o metabolismo mitocondrial e celular de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo que foram submetidos a cirurgia para tratamento da epilepsia refratária;
- d) Avaliar a associação dos parâmetros mitocondriais e as frequências de crises epilépticas de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo que foram submetidos a cirurgia para tratamento da epilepsia refratária.

3 JUSTIFICATIVA

O Prêmio Nobel de 1950 foi concedido pela identificação das propriedades anti-inflamatórias dos glicocorticoides. Nesta perspectiva, vários estudos tem sido realizados para melhor entendimento da ação e dos danos destes esteroides. Atualmente não há estudos na literatura que avaliaram o efeito dos glicocorticoides na atividade metabólica mitocondrial do córtex e sistema límbico de tecido cérebral de humanos adultos. Devido à realização de cirurgia para controle da epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal (ELTM-EH) em pacientes refratários ao tratamento medicamentoso, surgiu uma oportunidade ética de obtenção de tecido cerebral humano para estudo e, a partir dele, avaliar a modulação das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial na amígdala, hipocampo e córtex temporal e sua relação com a administração de uma dose de glicocorticoide. Também, a determinação dos parâmetros clínicos, laboratoriais e operatórios que possam interferir na avaliação enzimática mitocondrial é importante para o planejamento adequado de novos estudos metabólicos e bioquímicos utilizando amostras cerebrais coletadas durante neurocirurgia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

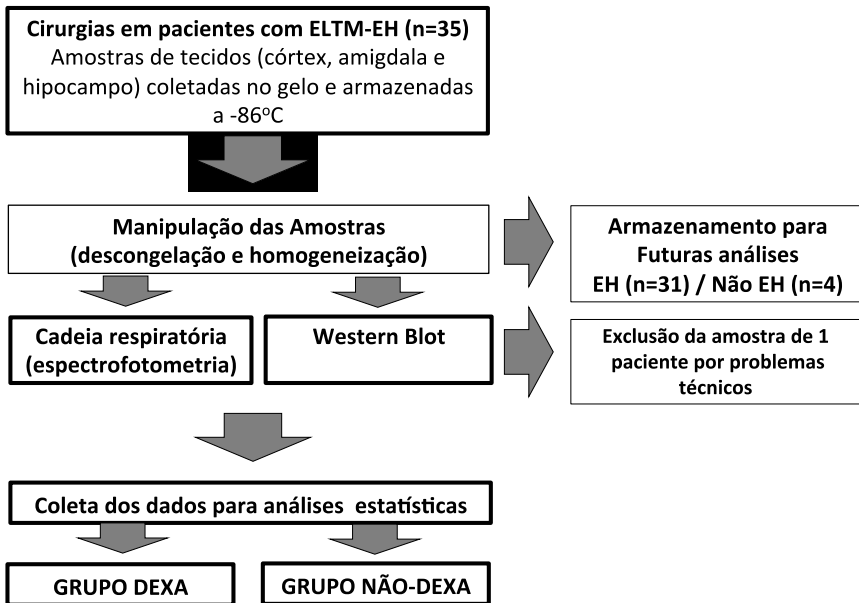
Este trabalho se trata de um estudo observacional, realizado com 24 (vinte e quatro) pacientes adultos com ELTM-EH resistentes à terapia medicamentosa e tratados cirurgicamente no período de fevereiro de 2009 a dezembro de 2011 no Centro de Epilepsia de Santa Catarina (CEPESC). No período do estudo, 35 pacientes foram submetidos à cirurgia para controle da epilepsia. Destes, após descongelação e homogeneização das amostras, apenas 25 pacientes foram inclusos para análise bioquímica dos parâmetros alvo deste estudo devido a quantidade insuficiente de material. Uma outra amostra foi excluída por problemas técnicos que impossibilitaram a mensuração laboratorial (ver Figura 4).

O CEPESC é um centro de referência para epilepsia refratária que abrange uma população de 6 milhões de pessoas, em Santa Catarina. Todos os pacientes apresentavam convulsões que comprometiam a consciência e que ocorriam pelo menos uma vez ao mês, apesar do tratamento medicamentoso com pelo menos duas drogas antiepilépticas em doses adequadas.

Foi coletada a história médica completa dos pacientes. Todos apresentavam semiologia de convulsões, análise de vídeo-EEG interictal e ictal, imagem de ressonância nuclear magnética, exame neurológico, avaliação psiquiátrica e neuropsicológica consistentes com ELTM-EH (Alexandre et al, 2006; Guarnieri et al, 2009; Araújo et al, 2006; Nunes et al, 2011).

Os pacientes foram divididos em 2 grupos de acordo com a administração de dexametasona no momento da indução anestésica (grupo dexametasona e grupo não-dexametasona). Durante o procedimento cirúrgico, foram coletadas amostras teciduais da amígdala, hipocampo e córtex temporal.

Figura 4 - Fluxograma de inclusão dos pacientes na análise dos resultados



4.1.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram:

- a) Semiologia de convulsões consistente com ELTM-EH, geralmente com mal estar epigástrico ascendente autônomo ou auras psíquicas, seguido de parada comportamental, turvação progressiva da consciência e/ou automatismos oro-alimentares e manuais;
- b) Refratariedade ao tratamento medicamentoso com drogas antiepiléticas orais e indicação de cirurgia para controle da epilepsia;
- c) Nenhuma lesão estrutural diferente de atrofia e aumento do sinal na formação do hipocampo, identificado por ressonância nuclear magnética;
- d) Picos interictais anteriores ou mesiais;
- e) Monitoramento de vídeo de eletroencefalograma (EEG)

- consistentes com epilepsia do lobo temporal;
- f) Presença de amostras coletadas e processadas para análise de componentes da cadeia respiratória mitocondrial;
 - g) Concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.1.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram:

- a) Diagnóstico de uma síndrome epilética diferente da ELTM-EH unilateral;
- b) Alterações neurológicas focais no exame físico;
- c) Retardo mental com comprometimento cognitivo à avaliação neuropsicológica e psiquiátrica;
- d) Picos do EEG interictal extra temporais ou generalizadas;
- e) Amostra insuficiente ou com problemas técnicos para a análise de componentes da cadeia respiratória mitocondrial.
- f) Recusa ou incapacidade de compreender o TCLE.

4.2 VARIÁVEIS CLINICO-DEMOGRÁFICAS

As características clínicas analisadas foram: sexo, raça, estado civil, atividade de trabalho atual, história positiva de uma lesão precipitante inicial, história familiar positiva de convulsões, lado da anormalidade mesial temporal, idade, escolaridade, tempo de doença (em anos), idade de início da epilepsia (convulsões recorrentes).

Os pacientes foram considerados sob monoterapia se fizessem uso de apenas uma droga antiepilética (DAE). Os pacientes que faziam uso de duas ou mais DAE, associadas ou não com benzodiazepínicos (BDZs), foram classificados como sob politerapia. Os medicamentos antiepiléticos utilizados foram: carbamazepina (CBZ), oxycarbamazepina (OXCZ), fenobarbital (PNB), difenilhidantoina (DPH), ácido valpróico (VA), lamotrigina (LMT) ou topiramato (TPM). Os BDZs utilizados foram clobazam ou clonazepam.

Avaliações psiquiátricas foram feitas como descrito anteriormente pelo nosso grupo (Guarnieri et al, 2005; Guarnieri et al, 2009) e incluíram diagnósticos de eixo I de acordo com os critérios do DSM-IV:

- a) Sem diagnóstico psiquiátrico;
- b) Depressão;
- c) Transtornos de ansiedade.

Outros distúrbios psiquiátricos específicos associados à epilepsia:

- a) Transtorno disfórico interictal;
- b) Ansiedade pós-ictal,
- c) Psicose pós-ictal,
- d) Psicose interictal.

A qualidade de vida (QOLIE) foi avaliado pelo escore total da versão brasileira do QOLIE31 (da Silva et al, 2007) como também descrito anteriormente por nosso grupo (Pauli et al, 2012).

4.3 PROTOCOLO DE ANESTESIA E TRATAMENTO COM DEXAMETASONA

O protocolo anestésico foi o mesmo para todos os pacientes exceto para a administração de dexametasona. Esta, foi introduzida pela equipe de anestesiologia como terapia anti-inflamatória adjuvante após a inclusão do décimo primeiro paciente no estudo. Esta modificação não foi baseada em quaisquer variáveis clínicas ou laboratoriais dos pacientes, apenas por mudança da literatura médica corrente.

Uma dose única de dexametasona (10 mg, endovenoso, em *bolus*) foi administrada entre o período das 07:30 e 08:30, no momento em que se iniciou o procedimento anestésico. Todos os tratamentos antiepilépticos foram mantidos até a cirurgia (dose pré-operatória às 6 da manhã) e reintroduzido o mais rapidamente possível após o paciente acordar da anestesia.

Os pacientes que não estavam sob uso de fenitoína receberam uma dose de 10 mg/kg de peso corporal de fenitoína endovenosa (EV) 8 a 10 horas antes da indução anestésica e uma dose suplementar de 10 mg/kg EV após o hipocampo ser removido. Aqueles pacientes que estavam sendo tratados com fenitoína em casa, receberam a sua dose matinal oral (VO) e apenas a dose complementar EV de 10 mg/kg no

transoperatório.

A anestesia foi induzida com propofol (2 mg/kg, EV, em *bolus*), fentanil, (2 mg/kg, EV, em *bolus*) e rocurônio (0,9 mg/kg, EV, em *bolus*). A mesma foi mantida com remifentanil na bomba de infusão (0,1 a 0,2 ug/kg, EV) e isoflurano inalado (0,5 a 0,6 CAM).

Os pacientes receberam infusão salina isotônica continua a uma taxa de 1,2 ml/kg/hora, mais a metade do volume de diurese. Profilaxia antibiótica com cefalotina (dose de 30 mg/kg) foi realizada 30 minutos antes da anestesia e repetida 4 horas após a primeira dose.

4.4 VARIÁVEIS CIRÚRGICAS E AMOSTRA DE TECIDO CEREBRAL TRANSOPERATÓRIO

Todos os procedimentos cirúrgicos e a coleta de tecido cerebral foram feitos pelo mesmo neurocirurgião (M.N.L.) e mesmo pesquisador (R.W.).

O tecido cerebral foi obtido a partir da área removida para o tratamento cirúrgico da epilepsia do paciente. Todas as amostras teciduais foram congeladas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e, em seguida, transferidos para um congelador a -86°C para as análises bioquímicas posteriores. O período de tempo desde o início da anestesia até o momento em que cada amostra foi congelada foi anotado.

A abordagem cirúrgica foi semelhante para todos os pacientes. O neurocirurgião ressecou um máximo de 4 cm do lobo temporal látero-anterior, incluindo giro temporal médio e inferior. Antes da ressecção cortical temporal, uma amostra cortical de 0,5 a 1 cm² do córtex temporal médio (localizada 3 cm posterior ao lobo temporal) foi delicadamente dissecada da substância branca com um bisturi, sem termo-coagulação. Depois de avaliar a região temporal mesial (incluindo suas regiões basais e laterais) foram coletados 2/3 da amígdala por meio de pinças e sem termo-coagulação. Após a ressecção da amígdala, o hipocampo foi removido "em bloco" e a cabeça do hipocampo foi rapidamente dissecada em vidro refrigerado com gelo e congelados em nitrogênio líquido. O período de tempo de manipulação do hipocampo, desde que o cirurgião começou a eletrocoagulação bipolar do suprimento vascular do hipocampo até sua ressecção completa, também foi anotado.

Os parâmetros hemodinâmicos e respiratórios permaneceram estáveis durante todos os procedimentos e nenhuma complicação transoperatória foi relatada nos pacientes do estudo.

Gasometria arterial, eletrólitos, hematócrito, hemoglobina, parâmetros ácido-básicos e hemodinâmicos (frequência cardíaca, frequência respiratória e pressão arterial média) foram anotados quando a amígdala foi ressecada.

4.5 PREPARAÇÃO TECIDUAL E HOMOGENEIZAÇÃO

As amostras foram pesadas e homogeneizadas mecanicamente em quatro volumes (v/v) de Tris 50 mM, pH 7,0, EDTA 1,0 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2,0 mM, 1% de Triton X-100, 10% de glicerol e *cocktail* inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), usando um tipo de vidro moído Potter-Elvehjem homogeneizador.

Os homogeneizados foram colocados em gelo durante 10 min e centrifugados a 3000 xg a 4°C durante 10 min. Parte dos sobrenadantes foram utilizados para medir as atividades dos complexos mitocondriais, após a descongelação das amostras de três vezes.

Para a análise de Western Blot, o resto dos sobrenadantes foram centrifugados a 10.000 xg a 4°C, durante 10 minutos para limpar os debris. A preparação das amostras foi efetuada numa centrífuga *Eppendorf 5415R* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

4.6 ATIVIDADES DOS COMPLEXOS DE CADEIA RESPIRATÓRIA

A atividade dos complexos mitocondriais foram medidos espectrofotometricamente utilizando um espectrofotômetro *Varian Cary 50* com controle de temperatura (Varian Inc., Palo Alto, CA, EUA). A atividade dos complexos foi medida por meio da taxa de redução ferricianeto dependente de NADH a 420 nm (Cassina et al, 1996). As atividades de succinato-2,6-dicloroindofenol (DCIP)-oxidoreductase (complexo II) e succinato de oxidoreductase de fenazina (succinato-desidrogenase - SDH; complexo II) foram determinados de acordo com Fischer et al, 1985. A oxidase de citocromo c (complexo IV) foi analisada de acordo com Rustin et al, 1994. Os métodos descritos para medir

essas atividades foram ligeiramente modificados conforme detalhado em um relatório anterior do nosso grupo (Latini et al, 2005). As atividades foram calculados como μ ou η mol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína.

4.7 WESTERN BLOT

4.7.1 Produtos químicos para a Western Blot

HEPES, Triton X-100, SDS, acrilamida, cloreto de bis-acrilamida e Hybond ECL de nitrocelulose foram obtidos de *GE Healthcare Life Science* (Piscataway, NJ, EUA). Glicina, tris, de TEMED, e β mercaptoetanol foram obtidos a partir de *Life Science Amresco* (Solon, OH, EUA). Albumina sérica bovina (BSA) foi de *Inlab* (São Paulo, SP, Brasil). Anti roedores-IgG de cabra HRP (*horseradish peroxidase-conjugado*) foi adquirido a partir da *Millipore* (Billerica, MA, EUA) (26). Persulfato de amônio (APS) foi adquirido a partir da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA).

Reagente LumiGLO (*luminol chemiluminescent substrate*) e Anti-GFAP de ratos foram obtidos a partir de *Cell Signaling Technology* (Beverly, MA, USA). Anti-GluR1 de ratos e anticorpos anti- β actin foram obtidos a partir de *Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, CA, USA). Todos os outros reagentes eram de grau analítico.

4.7.2 Análise de Western Blot

O ELTM-EH está associado a um grau variável de perda neuronal e astrogliose que pode estar relacionada a alterações no metabolismo e na função mitocondrial. Para controlar a quantidade de astrócitos e o quantidade de glutamato neuronal entre as amostras, foram analisados o GFAP (*immunecontent of glial ácida fibrilar Protein*) e os níveis de receptores AMPA glutamatérgicos - GluR1.

Além disso, os filamentos de β -actina e conteúdo de proteína total foram também controlada em todas as amostras analisadas. A análise Western Blot foi realizada para quantificação do imunoc conteúdo de GFAP e GluR1 (Cordova et al, 2004; Posser et al, 2007; Leal et al, 1997; Lopes et al, 2012; Lopes et al, 2013).

Os sobrenadantes obtidos foram diluídos 1/1 (v/v) em Tris 100 mM, pH 6,8, EDTA 4 mM, e 8% de SDS e foram, em seguida, fervida durante 5 min. Após, o tampão de carga (glicerol a 40%, Tris 100 mM, azul de bromofenol, pH 6,8) na proporção de 25:100 (v/v) e β -mercaptoetanol (concentração final de 8%) foram adicionados às amostras (Cordova et al, 2004; Posser et al, 2007). O teor de proteína foi estimada pelo método descrito por Peterson et al. 1977.

A mesma quantidade de proteína (70ug) de uma amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio 10% (SDS-PAGE) minigels e transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando um aparelho de blotting semi-seca (1,2 mA / cm²; 1,5 h). Para verificar a eficiência do processo de transferência, os géis foram corados com azul de Coomassie e as membranas foram coradas com Ponceau S.

As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em solução salina tamponada com Tris (TBS) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Os alvos foram detectadas após incubação durante a noite com anticorpos específicos diluídos em TBS com Tween (TBS-T) que continha 2% de BSA em uma diluição 1:1000 (anti-GluR1 total e anti-GFAP).

Além disso, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com HRP HRP conjugado a anticorpo secundário para a detecção dos alvos. As reações foram desenvolvidas pela substrato quimioluminescência (LumiGLO). Todos os passos de bloqueio e incubação foram seguido de lavagem por três vezes (5 min) com TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, 0,1% de Tween-20, pH 7,5). Todas as membranas foram incubadas com anticorpo de rato anti- β -actina (1:2000) para verificar que quantidades iguais de proteína em cada amostra foram carregadas no gel. O imunoconteúdo foi determinado como a razão entre a densidade óptica (DO) da banda de proteína / DO da banda de β -actina (Posser et al, 2007; Calloni et al, 2005).

As bandas foram quantificadas utilizando o software *Scion Image*®, que é um derivado de imagem de NIH (Frederick, MD, EUA). Anticorpos Anti-GluR1 detectado uma única banda de aproximadamente 100 kDa; anti-GFAP detectado uma única banda de aproximadamente 50 kDa e anticorpo anti- β actina detectada uma única banda de aproximadamente 45 kDa.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações foram realizadas entre os dois grupos de pacientes (grupo dexametasona e grupo não-dexametasona). Diferenças nas variáveis categóricas foram analisadas pelos testes *qui-quadrado* e exato de Fisher. As diferenças nas variáveis contínuas foram analisados pelo teste *t* de *Student* ou ANOVA independente.

Regressão linear foi realizada para identificar os preditores independentes das atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial de cada uma das diferentes regiões cerebrais estudadas. Para esta análise, incluímos as variáveis identificadas pela análise univariada anterior com um nível de "p" inferior a 0,15. Para o modelo final mantemos as variáveis que mostraram uma associação significativa com a variável dependente com um nível de $p \leq 0,05$. Nós não aplicamos o ajuste para múltiplos testes utilizando um critério mais rigoroso para o nível "p" para evitar erro tipo II (Perneger, 1998).

O desequilíbrio na distribuição entre os parâmetros clínicos, hemodinâmicos, hematológicos, bioquímicos e transoperatórios entre os grupos sobre os parâmetros mitocondriais foram controlados por uma análise de regressão binária "*forward stepwise*". Para esta análise as variáveis associadas ao tratamento com dexametasona e parâmetro mitocondrial mostrando um "p" nível inferior a 0,15 na análise univariada foram inicialmente incluídos no modelo. Valores de "p" inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

Este estudo tem um poder $(1 - \beta)$ 0,72 para detectar uma diferença de 20% na média da atividade dos complexos mitocôndrias analisados associadas ao tratamento com dexametasona, com um desvio padrão de até 20% da média em cada grupo. Um critério mais rigoroso para o nível de "p" devido ao ajuste para múltiplos testes (Peneger, 1998) com $p < 0,01$ reduziria o poder do estudo para 0,45.

Todos os testes foram realizados pelo *software* SPSS, versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL , EUA)

4.9 ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi realizado considerando os pressupostos éticos da resolução CNS 466/12. Foi obtido TCLE de todos

paciente para a inclusão no estudo. O trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (parecer número 365 FR 304969).

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos durante o doutorado foram divididos em 3 capítulos:

5.1 CAPÍTULO I: Atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em tecido cerebral humano congelado: Implicações metodológicas da coleta e armazenamento das amostras

5.2 CAPÍTULO II: Efeito de uma dose única de dexametasona sobre a atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial do córtex, amígdala e hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo

5.3 CAPÍTULO III: Associação entre a frequência de crises epiléticas e a atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória em estruturas do lobo temporal de pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo.

5.1 CAPÍTULO I - Atividade Enzimática dos Complexos da Cadeia Respiratória Mitocondrial em Tecido Cerebral Humano Congelado: Implicações Metodológicas da Coleta e Armazenamento das Amostras

As variáveis clínicas, demográficas e neurorradiológicas dos pacientes com ELTM-EH estão apresentadas na tabela 1. Também, nesta mesma tabela há a descrição dos parâmetros intra-operatórios, hemodinâmicos, laboratoriais e as atividades das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial de acordo com a região do cérebro analisado.

A tabela 2 mostra a análise univariada da associação entre os parâmetros hemodinâmicos e laboratoriais e a respiração mitocondrial das amostras do córtex temporal.

A tabela 3 mostra a análise univariada das associações entre os parâmetros hemodinâmicos e laboratoriais e a respiração mitocondrial de amostras da amígdala e a tabela 4 mostra a análise univariada das mesmas associações no tecido do hipocampo.

As variáveis associadas de forma independente com a atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial nas

amostras de córtex, amígdala e hipocampo são apresentadas na tabela 5.

A combinação de variáveis preditivas difere de acordo com as enzimas estudadas. Curiosamente, o tempo desde a última crise convulsiva e a coleta de amostra cerebral apresentou uma tendência ($p = 0,08$) em direção a associação negativa com a atividade do complexo I no hipocampo, mas uma associação significativamente positiva na amígdala ($p = 0,04$).

O modelo de regressão linear incluindo a pressão arterial média e a saturação de oxigênio mostrou uma boa e significativa associação com a atividade enzimática do complexo I no córtex temporal e explica 38% da sua variação. Na mesma estrutura, apenas o tempo de armazenamento permaneceu associado com a atividade do complexo II e explica 71% da sua variação.

O modelo incluindo os níveis de hemoglobina, tempo desde a anestesia até a coleta da amostra do córtex cerebral e os níveis séricos de glicose mostrou uma boa e significativa associação com a atividade da succinato-desidrogenase e explica 52% da variação da atividade enzimática. Ainda em relação ao córtex, apenas o tempo de armazenamento das amostras cerebrais permaneceu associado com a atividade do complexo IV entre todas as variáveis analisadas.

Na amígdala, apenas o tempo desde a última crise convulsiva foi associada com a atividade enzimática do complexo I. Na mesma estrutura, o tempo de armazenamento das amostras mostrou uma boa e significativa associação com o complexo II e explica 41% da sua variação. Apenas o tempo de armazenamento foi associado com a atividade da succinato-desidrogenase na amígdala e explica 39% da variação da atividade enzimática nesta estrutura. Ainda na amígdala, 53% da variação enzimática no complexo IV foi associada com o tempo de anestesia.

Entre as amostras do hipocampo, o tempo desde a última crise convulsiva mostrou uma tendência não significativa para a associação negativa com a atividade enzimática do complexo I. Na mesma estrutura, o tempo de armazenamento das amostras e a percentagem de saturação de O_2 apresentaram uma associação forte e significativa com a atividade do complexo II e explicou 64% da sua variação.

O tempo de armazenamento apresentou uma associação moderada e significativa com a atividade da succinato-

desidrogenase e explicou 31% da sua variação atividade enzimática no hipocampo. Nesta estrutura também, a atividade enzimática do complexo IV mostrou um modelo de associação com a hemoglobina e apresentou uma tendência não significativa ($p = 0,10$) para uma associação moderada com a atividade enzimática. Esta tendência explicou 34% da variação.

Tabela 1 - Variáveis clínicas, demográficas, neurorradiológicas, neurocirúrgicas, laboratoriais e hemodinâmicas de pacientes com ELTM-EH resistentes a medicamentos orais

Variáveis	Todos os Casos (n = 24)
Gênero	
Feminino	15 (62,5)
Masculino	9 (37,5)
Raça	
Caucasiano	20 (83,3)
Pardo e negro	4 (16,7)
Lado da esclerose de hipocampo	
Direito	12 (50,0)
Esquerdo	12 (50,0)
Regime de tratamento com drogas antiepilépticas	
Monoterapia	10 (41,7)
Politerapia	14 (58,3)
Uso de drogas antiepilépticas	
Benzodiazepínicos	11 (45,8)
Carbamazepina	19 (79,2)
Fenobarbital	7 (29,2)
Fenitoína	3 (12,5)
Oxycarbamazepina	3 (12,5)
Lamotrigina	3 (12,5)
Topiramato	2 (8,3)
Ácido Valpróico	2 (8,3)

Variáveis	Todos os Casos (n = 24)
Diagnósticos Psiquiátricos	
Sem diagnósticos psiquiátricos	10 (41.7)
Depressão	8 (33.3)
Transtornos de Ansiedade ^a	2 (8.3)
Outras condições psiquiátricas ^b	4 (12.5)
Idade (anos)	37.1 (2.0)
Anos de educação	7,0 (0,6)
Duração da doença (anos)	25,5 (2,0)
Idade de início da epilepsia (anos)	11,6 (1,7)
Frequência de crises Mensais	8,4 (1,6)
Parâmetros Transoperatórios	
Pressão arterial média (mmHg)	68,0 (1,9)
Frequência cardíaca (bpm ^c)	71,1 (2,5)
Frequência respiratória (mrpm ^d)	11,9 (0,3)
Tempo coleta tecido córtex (min)	188,4 (8,0)
Tempo coleta tecido amígdala e hipocampo (min)	255,0 (10,8)
Tempo de manipulação do hipocampo (min)	13,0 (1,9)
Parâmetros Gasométricos (mínimo – máximo)	
pH (7,35 – 7,45)	7,43 (0,01)
pCO ₂ (19,3 – 37,9) mmHg	28,4 (0,8)
pO ₂ (99,5 – 319,8) mmHg	227,4 (13,9)
Bicarbonato (17,3 – 23,3) mEq/L	20,3 (0,3)
CO ₂ total (18,2 – 30,7) mMol/L	21,6 (0,5)
Excesso de base (6,4 – 0,5) mEq/L	- 2,6 (0,4)
Saturação de O ₂ (99,1 – 99,9) %	99,6 (0,1)
Parâmetros Hematológicos (mínimo – máximo)	
Hematócrito (31 - 43) %	34,4 (0,8)
Hemoglobina (10,2 – 14,2) g/dL	11,4 (0,3)

Variáveis	Todos os Casos (n = 24)
Parâmetros Bioquímicos (mínimo – máximo)	
Glicose (86 – 193) mg/dL	112,7(5,9)
Sódio (129 – 143) mEq/L	137,7 (0,7)
Potássio (3,6 – 5,0) mEq/L	4,1 (0,1)
Cálcio iônico (0,5 – 4,7) mg/dL	4,1 (0,2)
Magnésio (0,38 – 0,53) mg/dL	0,46 (0,0)
Ácido Láctico (0,5 – 3,4) mMol/L	1,8 (0,2)

**Atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial
($\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$)**

Área Cerebral	Média (Erro Padrão)
NEOCORTEX	
Complexo I	764,2 (23,6)
Complexo II	1,53 (0,79)
Succinato-desidrogenase	2,03 (0,17)
Complexo IV	4,42 (0,29)
GFAP ^g	111,5 (1,8)
GluR1 ^g	101,3 (1,7)
AMIGDALA	
Complexo I	754,84 (25,01)
Complexo II	1,29 (0,07)
Succinato-desidrogenase	2,67 (0,24)
Complexo IV	3,22 (0,14)
GFAP ^g	107,1 (1,5)
GluR1 ^g	97,5 (2,6)
HIPOCAMPO	
Complexo I	696,76 (15,01)
Complexo II	1,05 (0,50)
Succinato-desidrogenase	2,41 (0,16)
Complexo IV	3,21 (0,15)
GFAP ^g	106,5 (1,7)
GluR1 ^g	95,0 (3,7)

Variáveis	Todos os Casos (n = 24)
^a Transtornos de Ansiedade: Transtorno de ansiedade generalizada (n=1); fobia social (n=1)	
^b Outros transtornos psiquiátricos: psicose interictal (n=2); ansiedade pós-ictal (n=1), transtorno disfórico interictal (n=1)	
^c bpm: batimentos por minuto;	
^d mrpm: movimentos respiratórios por minuto;	
^e Imunoconteúdo do GFAP (<i>glial fibrillary acidic protein</i>) determinado por w	
^f Imunoconteúdo do GluR1 (<i>glutamate receptor sub-unit 1</i>) determinado por w	
^g razão entre a densidade óptica (DO) da banda de proteína / DO da banda	

Tabela 2 - Associação entre os parâmetros hemodinâmicos e laboratoriais e a respiração mitocondrial de amostras do córtex temporal médio coletadas de pacientes com ELTM-EH resistentes a medicamentos orais

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
Parâmetros hemodinâmicos e duração da anestesia								
Pressão arterial média (mmHg)	r = 0,40 B = 4,60	r ² = 0,16 p = 0,06	r = 0,11 B = 0,00	r ² = 0,01 p = 0,61	r = 0,36 B = 0,03	r ² = 0,13 p = 0,09	r = 0,06 B = 0,01	r ² = 0,00 p = 0,78
Frequência cardíaca (bpm ^a)	r = 0,24 p = 0,29	r ² = 0,06 B = - 2,07	r = 0,06 B = - 0,00	r ² = 0,00 p = 0,79	r = 0,03 B = - 0,00	r ² = 0,00 p = 0,89	r = 0,17 B = - 0,02	r ² = 0,03 p = 0,44
Frequência respiratória (mrpm ^b)	r = 0,21 B = - 13,02	r ² = 0,04 p = 0,34	r = 0,08 B = - 0,02	r ² = 0,01 p = 0,73	r = 0,08 B = - 0,04	r ² = 0,01 p = 0,71	r = 0,08 B = - 0,07	r ² = 0,01 p = 0,72
Tempo coleta tecido córtex (min)	r = 0,43 B = 1,33	r ² = 0,19 p = 0,04	r = 0,49 B = 0,00	r ² = 0,24 p = 0,02	r = 0,34 B = 0,01	r ² = 0,12 p = 0,11	r = 0,16 B = 0,01	r ² = 0,03 p = 0,45
Parâmetros Gasométricos (mínimo – máximo)								
pH (7,35 – 7,45)	r = 0,28 B = - 804,25	r ² = 0,07 p = 0,19	r = 0,57 B = - 5,52	r ² = 0,32 p = 0,004	r = 0,03 B = - 0,55	r ² = 0,00 p = 0,90	r = 0,34 B = - 11,99	r ² = 0,11 p = 0,11
pCO ₂ (19,3 – 37,9) mmHg	r = 0,04 B = 1.16	r ² = 0,00 p = 0,85	r = 0,13 B = - 0,01	r ² = 0,02 p = 0,56	r = 0,12 B = - 0,03	r ² = 0,01 p = 0,56	r = 0,02 B = - 0,01	r ² = 0,00 p = 0,93

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
pO ₂ (99,5 – 319,8) mmHg	r = 0,17 B = - 2,95	r ² = 0,03 p = 0,41	r = 0,17 B = 0,00	r ² = 0,03 p = 0,43	r = 0,03 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,88	r = 0,24 B = 0,00	r ² = 0,06 p = 0,26
Bicarbonato (17,3 – 23,3) mEq/L	r = 0,09 B = -6,59	r ² = 0,01 p = 0,66	r = 0,27 B = - 0,06	r ² = 0,07 p = 0,20	r = 0,36 B = 0,18	r ² = 0,13 p = 0,08	r = 0,26 B = - 0,22	r ² = 0,07 p = 0,22
CO ₂ total (18,2 – 30,7) mMol/L	r = 0,01 B = - 0,32	r ² = 0,00 p = 0,97	r = 0,15 B = - 0,02	r ² = 0,02 p = 0,49	r = 0,45 B = 0,14	r ² = 0,20 p = 0,03	r = 0,29 B = - 0,16	r ² = 0,09 p = 0,16
Excesso base (- 6.4 - 0.5) mEq/L	r = 0,17 B = -10,69	r ² = 0,03 p = 0,41	r = 0,44 B = -0,90	r ² = 0,19 p = 0,03	r = 0,27 B = 0,12	r ² = 0,07 p = 0,20	r = 0,33 B = - 0,25	r ² = 0,11 p = 0,11
Saturação de O ₂ (99,1 – 99,9) %	r = 0,46 B = - 203,58	r ² = 0,21 p = 0,02	r = 0,61 B = -0,91	r ² = 0,38 p = 0,001	r = 0,01 B = - 0,40	r ² = 0,00 p = 0,95	r = 0,32 B = - 1,74	r ² = 0,10 p = 0,12
Parâmetros Hematológicos (mínimo – máximo)								
Hematócrito (31 - 43) %	r = 0,01 B = - 0,30	r ² = 0,00 p = 0,97	r = 0,22 B = - 0,2	r ² = 0,05 p = 0,32	r = 0,40 B = 0,10	r ² = 0,16 p = 0,06	r = 0,20 B = - 0,08	r ² = 0,04 p = 0,36
Hemoglobina (10,2 – 14,2) g/dL	r = 0,02 B = - 1,70	r ² = 0,00 p = 0,94	r = 0,27 B = - 0,08	r ² = 0,07 p = 0,23	r = 0,40 B = 0,29	r ² = 0,16 p = 0,06	r = 0,21 B = - 0,26	r ² = 0,05 p = 0,34

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
Parâmetros Bioquímicos (mínimo – máximo)								
Glicose (86 – 193) mg/dL	r = 0,26 B = - 1,26	r ² = 0,07 p = 0,29	r = 0,29 B = 0,00	r ² = 0,08 p = 0,25	r = 0,40 B = - 0,01	r ² = 0,16 p = 0,10	r = 0,02 B = - 0,00	r ² = 0,00 p = 0,95
Sódio (129 – 143) mEq/L	r = 0,11 B = -3,78	r ² = 0,01 p = 0,66	r = 0,29 B = - 0,03	r ² = 0,09 p = 0,21	r = 0,08 B = 0,02	r ² = 0,01 p = 0,73	r = 0,00 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,98
Potássio (3.6 – 5.0) mEq/L	r ² = 0,00 B = 13,78	r = 0,04 p = 0,86	r = 0,01 B = 0,01	r ² = 0,00 p = 0,97	r = 0,22 B = 0,53	r ² = 0,05 p = 0,34	r = 0,21 B = -0,87	r ² = 0,04 p = 0,37
Cálcio iônico (0.5 – 4.7) mg/dL	r = 0,08 B = 10,62	r ² = 0,01 p = 0,74	r = 0,12 B = - 0,04	r ² = 0,01 p = 0,63	r = 0,38 B = 0,36	r ² = 0,14 p = 0,11	r = 0,35 B = - 0,59	r ² = 0,12 p = 0,14
Magnésio (0.38 – 0.53) mg/dL	r = 0,32 B = 987,94	r ² = 0,10 p = 0,19	r = 0,00 B = -0,03	r ² = 0,00 p = 0,99	r = 0,14 B = - 2,81	r ² = 0,02 p = 0,57	r = 0,15 B = 5,94	r ² = 0,02 p = 0,55
Ácido Láctico (0.5 – 3.4) mMol/L	r = 0,26 B = - 32,41	r ² = 0,07 p = 0,26	r = 0,13 B = - 0,04	r ² = 0,02 p = 0,60	r = 0,17 B = 0,15	r ² = 0,03 p = 0,47	r = 0,39 B = - 0,59	r ² = 0,15 p = 0,09
Tempo desse a última convulsão (horas)^c	r ² = 0,02 B = 0,03	r = 0,13 p = 0,55	r = 0,04 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,84	r = 0,29 B = 0,00	r ² = 0,08 p = 0,19	r = 0,04 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,85

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
Tempo de armazenamento amostras em freezer (meses) ^d	r = 0,42 B = - 5,01	r ² = 0,17 p = 0,04	r = 0,84 B = - 0,03	r ² = 0,71 p < 0,0001	r = 0,27 B = - 0,02	r ² = 0,07 p = 0,21	r = 0,39 B = - 0,06	r ² = 0,15 p = 0,06

^a bpm: batimentos por minuto;

^b mrpm: movimentos respiratórios por minuto;

^c Intervalo de tempo desde a ocorrência da última crise convulsiva e a retirada da amostra de tecido cerebral;

^d Intervalo de tempo desde a retirada da amostra de tecido cerebral e a análise dos parâmetros bioquímicos;

Tabela 3 - Associação entre os parâmetros hemodinâmicos e laboratoriais e a respiração mitocondrial de amostras da amígdala coletadas de pacientes com ELTM-EH resistentes a medicamentos orais

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
Parâmetros hemodinâmicos e duração da anestesia								
Pressão arterial média (mmHg)	r = 0,36 B = 4,20	r ² = 0,13 p = 0,12	r = 0,03 B = - 0,00	r ² = 0,00 p = 0,91	r = 0,33 B = 0,04	r ² = 0,11 p = 0,16	r = 0,03 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,91
Frequência cardíaca (bpm ^a)	r = 0,05 B = 0,48	r ² = 0,00 p = 0,85	r = 0,22 B = 0,00	r ² = 0,05 p = 0,38	r = 0,07 B = 0,01	r ² = 0,01 p = 0,77	r = 0,26 B = 0,01	r ² = 0,07 p = 0,29
Frequência respiratória (mrpm ^b)	r = 0,15 B = - 10,09	r ² = 0,22 p = 0,55	r = 0,09 B = - 0,01	r ² = 0,01 p = 0,71	r = 0,01 B = - 0,00	r ² = 0,00 p = 0,97	r = 0,04 B = 0,01	r ² = 0,00 p = 0,88
Tempo coleta tecido amígdala (min)	r = 0,23 B = 0,52	r ² = 0,05 p = 0,34	r = 0,24 B = 0,00	r ² = 0,06 p = 0,33	r = 0,37 B = 0,01	r ² = 0,14 p = 0,12	r = 0,53 B = 0,01	r ² = 0,28 p = 0,02

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
Parâmetros Gasométricos (mínimo – máximo)								
pH (7,35 – 7,45)	r = 0,02 B = - 43,34	r ² = 0,00 p = 0,95	r = 0,47 B = - 3,43	r ² = 0,22 p = 0,04	r = 0,14 B = - 3,50	r ² = 0,02 p = 0,56	r = 0,06 B = - 1,01	r ² = 0,00 p = 0,78
pCO ₂ (19,3 – 37,9) mmHg	r = 0,16 B = - 4,05	r ² = 0,02 p = 0,50	r = 0,05 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,83	r = 0,32 B = - 0,08	r ² = 0,10 p = 0,17	r = 0,01 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,97
pO ₂ (99,5 – 319,8) mmHg	r = 0,14 B = 0,25	r ² = 0,02 p = 0,54	r = 0,03 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,91	r = 0,22 B = 0,00	r ² = 0,05 p = 0,35	r = 0,92 B = 0,00	r ² = 0,01 p = 0,70
Bicarbonato (17,3 – 23,3) mEq/L	r = 0,06 B = 3,64	r ² = 0,00 p = 0,81	r = 0,06 B = - 0,01	r ² = 0,00 p = 0,80	r = 0,70 B = - 0,04	r ² = 0,01 p = 0,77	r = 0,05 B = 0,02	r ² = 0,00 p = 0,83
CO ₂ total (18,2 – 30,7) mMol/L	r = 0,06 B = 2,57	r ² = 0,00 p = 0,79	r = 0,02 B = - 0,00	r ² = 0,00 p = 0,93	r = 0,15 B = 0,06	r ² = 0,02 p = 0,54	r = 0,00 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,99

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
Excesso base (- 6.4 - 0.5) mEq/L	r = 0,05 B = 2,73	r ² = 0,00 p = 0,84	r = 0,24 B = - 0,03	r ² = 0,06 p = 0,31	r = 0,10 B = - 0,05	r ² = 0,01 p = 0,68	r = 0,01 B = - 0,00	r ² = 0,00 p = 0,97
Saturação de O ₂ (99,1 – 99,9) %	r = 0,03 B = - 13,96	r ² = 0,00 p = 0,89	r = 0,39 B = - 0,45	r ² = 0,15 p = 0,09	r = 0,20 B = - 0,82	r ² = 0,04 p = 0,38	r = 0,11 B = - 0,27	r ² = 0,01 p = 0,64
Parâmetros Hematológicos (mínimo – máximo)								
Hematócrito (31 - 43) %	r = 0,06 B = 1,82	r ² = 0,00 p = 0,80	r = 0,03 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,88	r = 0,10 B = - 0,03	r ² = 0,01 p = 0,67	r = 0,25 B = - 0,04	r ² = 0,06 p = 0,28
Hemoglobina (10,2 – 14,2) g/dL	r = 0,06 B = 5,38	r ² = 0,00 p = 0,81	r = 0,00 B = - 0,00	r ² = 0,00 p = 0,99	r = 0,13 B = - 0,11	r ² = 0,02 p = 0,58	r = 0,27 B = - 0,14	r ² = 0,07 p = 0,25

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
Parâmetros Bioquímicos (mínimo – máximo)								
Glicose (86 – 193) mg/dL	r = 0,24 B = - 1,11	r ² = 0,06 p = 0,35	r = 0,17 B = 0,00	r ² = 0,03 p = 0,51	r = 0,18 B = 0,01	r ² = 0,03 p = 0,49	r = 0,20 B = 0,00	r ² = 0,04 p = 0,43
Sódio (129 – 143) mEq/L	r = 0,20 B = - 6,73	r ² = 0,04 p = 0,40	r = 0,06 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,80	r = 0,10 B = - 0,03	r ² = 0,01 p = 0,69	r = 0,18 B = - 0,03	r ² = 0,03 p = 0,45
Potássio (3.6 – 5.0) mEq/L	r = 0,12 B = - 37,97	r ² = 0,01 p = 0,62	r = 0,18 B = 0,14	r ² = 0,03 p = 0,46	r = 0,16 B = - 0,45	r ² = 0,02 p = 0,52	r = 0,06 B = - 0,10	r ² = 0,00 p = 0,81
Cálcio iônico (0.5 – 4.7) mg/dL	r = 0,00 B = 0,47	r ² = 0,00 p = 0,99	r = 0,22 B = 0,07	r ² = 0,05 p = 0,37	r = 0,05 B = 0,06	r ² = 0,00 p = 0,83	r = 0,04 B = 0,03	r ² = 0,00 p = 0,86
Magnésio (0.38 – 0.53) mg/dL	r = 0,37 B = - 1218,9	r ² = 0,14 p = 0,14	r = 0,13 B = - 1,08	r ² = 0,02 p = 0,61	r = 0,23 B = - 6,92	r ² = 0,05 p = 0,37	r = 0,34 B = - 6,18	r ² = 0,12 p = 0,18

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
Ácido Lático (0.5 – 3.4) mMol/L	r = 0,07 B = - 8,01	r ² = 0,00 p = 0,77	r = 0,08 B = 0,02	r ² = 0,00 p = 0,73	r = 0,14 B = 0,14	r ² = 0,02 p = 0,57	r = 0,05 B = 0,03	r ² = 0,00 p = 0,84
Tempo desse a última convulsão (horas) ^c	r = 0,48 B = 0,11	r ² = 0,23 p = 0,04	r = 0,04 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,87	r = 0,21 B = 0,00	r ² = 0,04 p = 0,40	r = 0,13 B = 0,00	r ² = 0,17 p = 0,61
Tempo de armazenamento amostras em freezer (meses) ^d	r = 0,24 B = -3,25	r ² = 0,06 p = 0,30	r = 0,62 B = - 0,02	r ² = 0,39 p = 0,003	r = 0,62 B = - 0,08	r ² = 0,39 p = 0,003	r = 0,24 B = - 0,02	r ² = 0,06 p = 0,31

^a bpm: batimentos por minuto;

^b mrpm: movimentos respiratórios por minuto;

^c Intervalo de tempo desde a ocorrência da última crise convulsiva e a retirada da amostra de tecido cerebral;

^d Intervalo de tempo desde a retirada da amostra de tecido cerebral e a análise dos parâmetros bioquímicos;

Tabela 4 - Associação entre os parâmetros hemodinâmicos e laboratoriais e a respiração mitocondrial de amostras da cabeça do hipocampo coletadas de pacientes com ELTM-EH resistentes a medicamentos orais

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
Parâmetros hemodinâmicos e duração da anestesia								
Pressão arterial média (mmHg)	r = 0,35 B = - 2,65	r ² = 0,12 p = 0,10	r = 0,04 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,86	r = 0,15 B = 0,01	r ² = 0,02 p = 0,50	r = 0,13 B = - 0,01	r ² = 0,02 p = 0,55
Frequência cardíaca (bpm ^a)	r = 0,05 B = - 0,31	r ² = 0,00 p = 0,82	r = 0,05 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,84	r = 0,08 B = 0,00	r ² = 0,01 p = 0,72	r = 0,12 B = 0,00	r ² = 0,01 p = 0,58
Frequência respiratória (mrpm ^b)	r = 0,35 B = - 14,67	r ² = 0,12 p = 0,11	r = 0,26 B = 0,04	r ² = 0,07 p = 0,24	r = 0,08 B = - 0,03	r ² = 0,01 p = 0,73	r = 0,09 B = - 0,03	r ² = 0,01 p = 0,70
Tempo coleta tecido hipocampo (min)	r = 0,10 B = - 0,14	r ² = 0,01 p = 0,67	r = 0,48 B = 0,00	r ² = 0,23 p = 0,02	r = 0,25 B = 0,00	r ² = 0,06 p = 0,26	r = 0,19 B = - 0,00	r ² = 0,04 p = 0,39

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
Tempo manipulação hipocampo (min)	r = 0,22 B = 1,87	r ² = 0,05 p = 0,33	r = 0,38 B = - 0,01	r ² = 0,14 p = 0,09	r = 0,29 B = - 0,03	r ² = 0,84 p = 0,20	r = 0,13 B = - 0,01	r ² = 0,02 p = 0,57
Parâmetros Gasométricos (mínimo – máximo)								
pH (7,35 – 7,45)	r = 0,01 B = - 28,70	r ² = 0,00 p = 0,94	r = 0,40 B = - 2,79	r ² = 0,16 p = 0,05	r = 0,33 B = - 6,76	r ² = 0,11 p = 0,11	r = 0,03 B = 0,53	r ² = 0,00 p = 0,89
pCO ₂ (19,3 – 37,9) mmHg	r = 0,13 B = 2,46	r ² = 0,02 p = 0,53	r = 0,20 B = - 0,01	r ² = 0,04 p = 0,35	r = 0,10 B = - 0,02	r ² = 0,01 p = 0,63	r = 0,11 B = 0,02	r ² = 0,01 p = 0,59
pO ₂ (99,5 – 319,8) mmHg	r = 0,20 B = - 0,22	r ² = 0,04 p = 0,34	r = 0,06 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,78	r = 0,34 B = - 0,00	r ² = 0,12 p = 0,10	r = 0,02 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,93
Bicarbonato (17,3 – 23,3) mEq/L	r = 0,01 B = 0,69	r ² = 0,00 p = 0,95	r = 0,25 B = - 0,04	r ² = 0,06 p = 0,23	r = 0,17 B = - 0,80	r ² = 0,03 p = 0,42	r = 0,07 B = 0,03	r ² = 0,00 p = 0,76

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
CO ₂ total (18,2 – 30,7) mMol/L	r = 0,08 B = - 2,41	r ² = 0,01 p = 0,70	r = 0,05 B = - 0,00	r ² = 0,00 p = 0,82	r = 0,06 B = - 0,02	r ² = 0,00 p = 0,77	r = 0,12 B = - 0,30	r ² = 0,01 p = 0,58
Excesso base (- 6.4 - 0.5) mEq/L	r = 0,02 B = - 0,97	r ² = 0,00 p = 0,91	r = 0,36 B = - 0,05	r ² = 0,13 p = 0,08	r = 0,26 B = - 0,11	r ² = 0,07 p = 0,22	r = 0,06 B = 0,02	r ² = 0,00 p = 0,77
Saturação de O ₂ (99,1 – 99,9) %	r = 0,17 B = - 48,49	r ² = 0,03 p = 0,42	r = 0,63 B = - 0,66	r ² = 0,40 p = 0,001	r = 0,55 B = - 1,68	r ² = 0,30 p = 0,006	r = 0,04 B = - 0,10	r ² = 0,00 p = 0,86
Parâmetros Hematológicos (mínimo – máximo)								
Hematócrito (31 - 43) %	r = 0,21 B = -4,51	r ² = 0,04 p = 0,34	r = 0,09 B = - 0,00	r ² = 0,01 p = 0,68	r = 0,03 B = - 0,01	r ² = 0,00 p = 0,90	r = 0,36 B = 0,07	r ² = 0,13 p = 0,10
Hemoglobina (10,2 – 14,2) g/dL	r = 0,20 B = - 12,97	r ² = 0,04 p = 0,37	r = 0,11 B = - 0,02	r ² = 0,01 p = 0,63	r = 0,00 B = - 0,00	r ² = 0,00 p = 0,98	r = 0,32 B = 0,20	r ² = 0,10 p = 0,14

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
Parâmetros Bioquímicos (mínimo – máximo)								
Glicose (86 – 193) mg/dL	r = 0,07 B = -0,23	r ² = 0,01 p = 0,77	r = 0,07 B = 0,00	r ² = 0,01 p = 0,77	r = 0,26 B = -0,01	r ² = 0,07 p = 0,30	r = 0,20 B = -0,00	r ² = 0,04 p = 0,43
Sódio (129 – 143) mEq/L	r = 0,11 B = -2,63	r ² = 0,01 p = 0,63	r = 0,38 B = -0,02	r ² = 0,11 p = 0,15	r = 0,18 B = -0,03	r ² = 0,03 p = 0,44	r = 0,22 B = -0,05	r ² = 0,05 p = 0,34
Potássio (3.6 – 5.0) mEq/L	r = 0,10 B = 20,57	r ² = 0,01 p = 0,68	r = 0,04 B = 0,02	r ² = 0,00 p = 0,86	r = 0,01 B = 0,01	r ² = 0,00 p = 0,98	r = 0,30 B = 0,60	r ² = 0,09 p = 0,20
Cálcio iônico (0.5 – 4.7) mg/dL	r = 0,24 B = 20,07	r ² = 0,06 p = 0,32	r = 0,03 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,91	r = 0,10 B = -0,07	r ² = 0,01 p = 0,69	r = 0,17 B = 0,14	r ² = 0,03 p = 0,47
Magnésio (0.38 – 0.53) mg/dL	r = 0,06 B = 111,09	r ² = 0,00 p = 0,82	r = 0,28 B = 1,41	r ² = 0,08 p = 0,26	r = 0,10 B = -1,60	r ² = 0,01 p = 0,69	r = 0,00 B = -0,04	r ² = 0,00 p = 0,99

Parâmetros transoperatórios Média (Erro Padrão)	Complexo I		Complexo II		Succinato- Desidrogenase		Complexo IV	
Ácido Láctico (0.5 – 3.4) mMol/L	r = 0,01 B = 0,87	r ² = 0,00 p = 0,96	r = 0,02 B = - 0,00	r ² = 0,00 p = 0,94	r = 0,03 B = - 0,02	r ² = 0,00 p = 0,89	r = 0,09 B = 0,07	r ² = 0,01 p = 0,69
Tempo desse a última convulsão (horas) ^c	r = 0,37 B = - 0,06	r ² = 0,14 p = 0,09	r = 0,17 B = 0,00	r ² = 0,03 p = 0,46	r = 0,05 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,81	r = 0,09 B = 0,00	r ² = 0,01 p = 0,69
Tempo de armazenamento amostras em freezer (meses) ^d	r = 0,26 B = 2,00	r ² = 0,07 p = 0,22	r = 0,75 B = - 0,02	r ² = 0,57 p = 0000	r = 0,56 B = - 0,05	r ² = 0,31 p = 0,004	r = 0,06 B = 0,00	r ² = 0,00 p = 0,79

^a bpm: batimentos por minuto;

^b mrpm: movimentos respiratórios por minuto;

^c Intervalo de tempo desde a ocorrência da última crise convulsiva e a retirada da amostra de tecido cerebral;

^d Intervalo de tempo desde a retirada da amostra de tecido cerebral e a análise dos parâmetros bioquímicos;

Tabela 5 - Modelo preditivo de regressão linear múltipla para cada enzima da cadeia respiratória mitocondrial em amostras do córtex temporal médio, amígdala e cabeça do hipocampo

Variáveis Predictoras	Coefficiente "B"	"p" valor
CORTEX TEMPORAL MÉDIO		
Complexo I		
Constante	22625,4	0,01
Pressão arterial média (mmHg)	6,32	0,007
Saturação de oxigênio (%)	- 223,7	0,01
Coeficientes da regressão linear: $r = 0,62$; $r^2 = 0,38$; $p = 0,008$		
Complexo II		
Constante	2,34	< 0,001
Tempo de armazenamento amostras em freezer (meses) ^a	- 0,03	< 0,001
Coeficientes da regressão linear: $r = 0,82$; $r^2 = 0,71$; $p < 0,0001$		
SHD		
Constante	- 3,43	0,19
Tempo coleta tecido córtex (min)	0,01	0,02
Hemoglobina	0,38	0,02
Glicose	- 0,01	0,10
Coeficientes da regressão linear: $r = 0,72$; $r^2 = 0,52$; $p = 0,01$		

Complexo IV

Constante	5,79	< 0,001
Tempo de armazenamento amostras em freezer (meses) ^a	- 0,06	0,05
Coeficientes da regressão linear: $r = 0,39$; $r^2 = 0,15$; $p = 0,05$		

AMIGDALA**Complexo I**

Constante	729,8	< 0,001
Tempo desde a última convulsão (horas) ^b	0,11	0,04
Coeficientes da regressão linear: $r = 0,48$; $r^2 = 0,23$; $p = 0,04$		

Complexo II

Constante	2,33	0,52
Tempo de armazenamento amostras em freezer (meses) ^a	- 0,02	0,03
Coeficientes da regressão linear: $r = 0,65$; $r^2 = 0,41$; $p = 0,03$		

SDH

Constant	4,36	< 0,0001
Tempo de armazenamento amostras em freezer (meses) ^a	- 0,08	0,003
Coeficientes da regressão linear: $r = 0,62$; $r^2 = 0,39$; $p < 0,003$		

Complexo IV

Constant	- 0,35	0,05
Tempo de anestesia (min) ^c	0,007	0,02
Coeficientes da regressão linear: $r = 0,53$; $r^2 = 0,14$; $p = 0,08$		

HIPOCAMPO

Complexo I

Constante	709,7	< 0,0001
Tempo desde a última convulsão (horas) ^b	- 0,06	0,08
Coeficientes da regressão linear: $r = 0,37$; $r^2 = 0,14$; $p = 0,08$		

Complexo II

Constante	34,5	< 0,04
Tempo de armazenamento amostras em freezer (meses) ^a	- 0,02	0,01
Saturação de oxigênio (%)	-0,33	0,05
Coeficientes da regressão linear: $r = 0,80$; $r^2 = 0,64$; $p < 0,0001$		

SDH

Constante	3,53	< 0,0001
Tempo de armazenamento amostras em freezer (meses) ^a	- 0,05	0,004
Coeficientes da regressão linear: $r = 0,56$; $r^2 = 0,31$; $p = 0,004$		

Complexo IV

Constante	0,75	0,61
Hemoglobina	0,07	0,10

Coeficientes da regressão linear: $r = 0,36$; $r^2 = 0,34$; $p = 0,10$

SDH: Succinato-Desidrogenase

^a intervalo de tempo de armazenamento das amostras em freezer desde o recolhimento transoperatório e a análise bioquímica (em meses)

^b intervalo de tempo desde a ocorrência da última convulsão e o recolhimento do tecido cerebral (horas);

^c intervalo de tempo desde a indução anestésica até a retirada a amostra do córtex (minutos)

5.2 CAPÍTULO II - Efeito de uma Dose Única de Dexametasona Sobre a Atividade Enzimática dos Complexos da Cadeia Respiratória Mitocondrial do Córtex, Amígdala e Hipocampo de Pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose do Hipocampo

A tabela 6 mostra a distribuição das variáveis clínicas, demográficas e neurorradiológicas dos pacientes de acordo com o uso da dexametasona. Havia mais pacientes recebendo politerapia ($p = 0,03$) e houve uma tendência não significativa ($p = 0,09$) para uma maior prevalência de pacientes do sexo masculino no grupo de dexametasona.

Os pacientes que receberam dexametasona tiveram frequência mensal de convulsões maior ($p = 0,05$). As distribuições de todas as outras variáveis foram semelhantes entre os grupos com e sem dexametasona (ver tabela 6).

O peso médio dos pacientes que receberam dexametasona foi de 61 ± 3 kg e a dose média utilizada foi de $0,17 \pm 0,01$ mg / kg (intervalo 0,12 a 0,21 mg / kg).

Tabela 6 - Variáveis clínicas, demográficas, neurorradiológicas e neurofisiológicas dos pacientes com ELTM-EH submetidos à cirurgia de acordo com o uso de dexametasona

Variáveis	Todos os Casos n = 24	Dexametasona		p Valor
		Não n = 10 (%)	Sim n = 14 (%)	
Gênero				
Feminino	15 (62,5)	4 (60,0)	11 (78,6)	0,09
Masculino	9 (37,5)	6 (40,0)	3 (21,4)	
Raça				
Caucasiano	20 (83,3)	8 (80,0)	12 (85,7)	1,0
Pardo e negro	4 (16,7)	2 (20,0)	2 (14,3)	
Estado Civil				
Solteiro	13 (54,2)	7 (70,0)	6 (42,9)	0,41
Casado	8 (33,3)	2 (20,0)	6 (42,9)	
Divorciado	3 (12,5)	1 (10,0)	2 (14,3)	
Ocupação profissional atual				
Trabalhando	11 (45,8)	5 (50,0)	6 (42,5)	0,46
Não trabalhando	11 (45,8)	5 (50,0)	6 (42,5)	
Afastado	2 (8,3)	0	2 (14,3)	

Variáveis	Todos os Casos n = 24	Dexametasona		p Valor
		Não	Sim	
		n = 10 (%)	n = 14 (%)	
História de injúria inicial precipitante da epilepsia				
Não	3 (12,5)	2 (20,0)	1 (7,1)	0,28
Sim	20 (83,3)	7 (70,0)	13 (92,9)	
Desconhecido	1 (4,2)	1 (10,0)	0	
História familiar de epilepsia				
Não	8 (33,3)	3 (20,0)	5 (35,7)	0,49
Familiares de segundo grau	8 (33,3)	2 (20,0)	6 (42,9)	
Familiares de primeiro grau	5 (20,8)	3 (39,0)	2 (14,3)	
Desconhecido	3 (12,5)	2 (20,0)	1 (7,1)	
Lado da esclerose de hipocampo				
Direito	12 (50,0)	3 (30,0)	9 (64,3)	0,21
Esquerdo	12 (50,0)	7 (70,0)	5 (35,7)	
Regime de tratamento com drogas antiepilépticas				
Monoterapia	10 (41,7)	7 (70,0)	3 (21,4)	0,03
Politerapia	14 (58,3)	3 (30,0)	11 (78,6)	

Variáveis	Todos os Casos n = 24	Dexametasona		p Valor
		Não	Sim	
		n = 10 (%)	n = 14 (%)	
Uso de benzodiazepínicos				
Sim	11 (45,8)	5 (50,0)	6 (42,9)	1,0
Não	13 (54,2)	5 (50,0)	8 (57,1)	
Uso de drogas antiepilépticas				
Carbamazepina				
Sim	19 (79,2)	7 (70,0)	12 (85,7)	0,61
Não	5 (20,8)	3 (30,0)	2 (14,3)	
Fenobarbital				
Sim	7 (29,2)	1 (10,0)	6 (42,9)	0,17
Não	17 (70,8)	9 (90,0)	8 (57,1)	
Fenitoína				
Sim	3 (12,5)	0	3 (21,4)	0,24
Não	21 (87,5)	10 (100)	11 (78,6)	

Variáveis	Todos os Casos n = 24	Dexametasona		p Valor
		Não	Sim	
		n = 10 (%)	n = 14 (%)	
Oxycarbamazepina				
Sim	3 (12,5)	2 (20,0)	1 (7,1)	0,55
Não	21 (87,5)	8 (80,0)	13 (92,9)	
Ácido Valpróico				
Sim	2 (8,3)	1 (10,0)	1 (7,1)	1,0
Não	22 (91,7)	9 (90,0)	13 (92,9)	
Lamotrigina				
Sim	3 (12,5)	2 (20,0)	1 (7,1)	0,55
Não	21 (87,5)	8 (80,0)	13 (92,9)	
Topiramato				
Sim	2 (8,3)	0	2 (14,3)	0,49
Não	22 (91,7)	10 (100)	12 (85,7)	
Presença de diagnósticos psiquiátricos				
Não	9 (37,5)	4 (40,0)	6 (42,9)	1,0
Sim	15 (62,5)	6 (60,0)	8 (57,1)	

Variáveis	Todos os Casos n = 24	Dexametasona		p Valor
		Não	Sim	
		n = 10 (%)	n = 14 (%)	
Diagnóstico Psiquiátrico				
Sem diagnósticos psiquiátricos	10 (41,7)	4 (40,0)	6 (42,9)	0,97
Depressão	8 (33,3)	3 (30,0)	5 (35,7)	
Transtorno de ansiedade ^a	2 (8,3)	1 (10,0)	1 (7,1)	
Outros transtornos psiquiátricos ^b	4 (12,5)	2 (20,0)	2 (14,3)	
Média (Erro Padrão)				
Idade (anos)	37,1 (2,0)	34,6 (4,1)	38,7 (3,0)	0,42
Anos de educação	7 (0,6)	7,0 (1,1)	7,1 (0,7)	0,96
Duração da doença (anos)	25,5 (2,0)	25,2 (3,4)	25,6 (2,6)	0,93
Idade de início da epilepsia (anos)	11,6 (1,7)	9,4 (1,9)	13,1 (2,4)	0,29
Frequência de crises mensais	8,4 (1,6)	4,3 (0,9)	11,0 (2,4)	0,05
QOLIE-31 ^c	34,4 (3,2)	36,9 (4,6)	32,6 (4,4)	0,87

^a Transtornos de Ansiedade: Transtorno de ansiedade generalizada (n=1); fobia social (n=1)

^b Outros transtornos psiquiátricos: psicose interictal (n=2); ansiedade pós-ictal (n=1), transtorno disfórico interictal (n=1)

^c QOLIE-31: *Quality of life in epilepsy inventory-31*.

A tabela 7 mostra os parâmetros hemodinâmicos, hematológicos, bioquímicos, de transoperatórios, neuroquímicos e tempo de armazenamento de amostras cerebrais de acordo com o tratamento com dexametasona.

Houve uma tendência não significativa ($p = 0,08$) de níveis sanguíneos elevados de glicose entre os pacientes tratados com dexametasona. Houve também uma tendência não significativa ($p = 0,10$) de um tempo inferior de armazenamento (congelamento) da amostra de tecido cerebral do grupo de pacientes que utilizou dexametasona em comparação com os pacientes não tratados.

Toda os outros parâmetros não diferiram significativamente entre os pacientes que receberam ou não a dexametasona ($p \geq 0,15$).

Tabela 7 - Parâmetros hemodinâmicos, hematológicos, bioquímicos, gasométricos, parâmetros transoperatórios, neuroquímicos e tempo de armazenamento de amostras dos pacientes com ELTM-EH submetidos à cirurgia de acordo com o uso de dexametasona

Variáveis	Todos os casos n = 24	Dexametasona		p Valor
		Não n = 10	Sim n = 14	
Média (Erro Padrão)				
Parâmetros Transoperatórios				
Pressão arterial média (mmHg)	68 (1,9)	64,2 (1,9)	70,4 (2,9)	0,15
Frequência cardíaca (bpm ^a)	71,1 (2,5)	68,7 (4,3)	72,8 (3,9)	0,43
Frequência respiratória (mrpm ^b)	11,9 (0,3)	11,7 (0,5)	12,1 (0,5)	0,58
Tempo coleta tecido córtex (min)	188,4 (8,0)	187,0 (10,2)	189,2 (12,2)	0,91
Tempo coleta tecido amígdala e hipocampo (min)	255 (10,8)	256,7 (18,4)	253,8 (13,8)	0,90
Tempo de manipulação do hipocampo (min)	13,0 (1,9)	15,0 (4,3)	11,8 (1,6)	0,43
Parâmetros Gasométricos (mínimo – máximo)				
pH (7,35 – 7,45)	7,43	7,42 (0,01)	7,43 (0,01)	0,66
pCO ₂ (19,3 – 37,9) mmHg	28,4 (0,8)	29,4 (1,5)	28,0 (0,9)	0,60
pO ₂ (99,5 – 319,8) mmHg	227,4 (13,9)	206,7 (26,3)	242,1 (14,5)	0,22
Bicarbonato (17,3 – 23,3) mEq/L	20,3 (0,3)	20,8 (0,5)	21,5 (0,7)	0,16
CO ₂ total (18,2 – 30,7) mMol/L	21,6 (0,5)	21,8 (0,6)	21,4 (0,8)	0,70
Excesso de base (6,4 – 0,5) mEq/L	- 2,6 (0,4)	- 2,2	- 2,9 (0,6)	0,41
Saturação de O ₂ (99,1 – 99,9) %	99,6 (0,1)	99,7 (0,1)	99,6 (0,1)	0,54

Variáveis	Todos os casos n = 24	Dexametasona		p Valor
		Não n = 10	Sim n = 14	
Parâmetros Hematológicos (mínimo – máximo)				
Hematócrito (31 - 43) %	34,4 (0,8)	34,2 (1,2)	34,6 (1,0)	0,81
Hemoglobina (10,2 – 14,2) g/dL	11,4 (0,3)	11,3 (0,4)	11,4 (0,3)	0,89
Parâmetros Bioquímicos (mínimo – máximo)				
Glicose (86 – 193) mg/dL	112,7(5,9)	98 (4,0)	120,0 (7,9)	0,08
Sódio (129 – 143) mEq/L	137,7 (0,7)	136,1 (1,4)	138,5 (0,8)	0,15
Potássio (3.6 – 5.0) mEq/L	4,1 (0,1)	4,2 (0,2)	4,0 (0,1)	0,30
Cálcio iônico (0.5 – 4.7) mg/dL	4,1 (0,2)	4,3 (0,1)	4,1 (0,3)	0,73
Magnésio (0.38 – 0.53) mg/dL	0,46 (0,0)	0,44 (0,0)	0,47 (0,0)	0,29
Ácido Lático (0.5 – 3.4) mMol/L	1,8 (0,2)	1,4 (0,2)	2,0 (0,3)	0,25
Tempo desse a última convulsão (horas) ^c				
	224,5 (97,2)	177,2 (59,8)	250,5 (160,7)	0,85
Tempo de armazenamento amostras em freezer (meses) ^d				
	24 (2,0)	27,8 (3,2)	21,3 (2,3)	0,10

^a bpm: batimentos por minuto;

^b mrpm: movimentos respiratórios por minuto;

^c Intervalo de tempo desde a ocorrência da última crise convulsiva e a retirada da amostra de tecido cerebral;

^d Intervalo de tempo desde a retirada da amostra de tecido cerebral e a análise dos parâmetros bioquímicos.

A tabela 8 mostra as atividades dos componentes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial de acordo com o tratamento com dexametasona. Houve uma tendência não significativa ($p = 0,08$) para os níveis mais altos de atividade da SDH na amígdala do grupo tratado com dexametasona em comparação com o grupo não tratado. Depois de uma análise de regressão para controlar gênero, regime de drogas antiepiléticas, níveis de glicose plasmática, frequência mensal de crises e tempo de congelamento das amostras, a SDH da amígdala não permaneceu associada ao tratamento com dexametasona ($p > 0,30$).

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo tratado e não tratado com outros componentes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial no córtex, amígdala e o hipocampo ($p > 0,22$).

Também, não houve diferenças estatisticamente significativas nas dosagens de GFAP e GluR1 nas amostras do córtex, amígdala e hipocampo entre os grupos que utilizaram ou não a dexametasona.

Tabela 8 - Atividade dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial, GFAP e GluR1 nos diferentes tecidos cerebrais dos pacientes com ELTM-EH submetidos à cirurgia de acordo com o uso de dexametasona

Atividade dos complexos Mitocondriais ($\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$)	Todos os Casos n = 24	Dexametasona		p Valor
		Não n = 10	Sim n = 14	
		Média (Erro Padrão)	Média (Erro Padrão)	
CÓRTEX				
Complexo I	764,2 (23,6)	746,0 (39,5)	777,2 (29,8)	0,53
Complexo II	1,53 (0,79)	1,44 (0,14)	1,60 (0,09)	0,31
Succinato-Desidrogenase	2,03 (0,17)	1,90 (0,26)	2,13 (0,23)	0,51
Complexo IV	4,42 (0,29)	4,34 (0,41)	4,48 (0,40)	0,82
GFAP ^{a*}	111,5 (1,8)	115,4 (3,7)	110,9 (1,1)	0,20
GluR1 ^{b*}	101,3 (1,7)	104,0 (3,2)	99,4 (1,6)	0,19
AMIGDALA				
Complexo I	754,84 (25,01)	731,97 (36,95)	767,15 (33,47)	0,52
Complexo II	1,29 (0,07)	1,25 (0,15)	1,31 (0,07)	0,65
Succinato-Desidrogenase	2,67 (0,24)	2,10 (0,41)	2,97 (0,26)	0,08[#]
Complexo IV	3,22 (0,14)	3,14 (0,20)	3,27 (0,19)	0,70
GFAP ^{a*}	107,1 (1,5)	106,9 (2,4)	107,2 (2,0)	0,92
GluR1 ^{b*}	97,5 (2,6)	96,3 (4,6)	98,2 (3,3)	0,72
HIPOCAMPO				
Complexo I	696,76 (15,01)	718,9 (22,2)	680,89 (20,01)	0,22
Complexo II	1,05 (0,50)	0,99 (0,11)	1,10 (0,05)	0,38
Succinato-Desidrogenase	2,41 (0,16)	2,34 (0,35)	2,46 (0,15)	0,73
Complexo IV	3,21 (0,15)	3,28 (0,19)	3,30 (0,22)	0,88
GFAP ^{a*}	106,5 (1,7)	104,9 (2,9)	107,6 (2,0)	0,45

Atividade dos complexos Mitocondriais ($\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteina}^{-1}$)	Todos os Casos n = 24	Dexametasona		p Valor
		Não n = 10	Sim n = 14	
GluR1 ^{b*}	95,0 (3,7)	89,4 (6,8)	99,0 (3,9)	0,20

[#]A administração de dexametasona não permanece associada à atividade da enzima Succinato-Desidrogenase (SDH) da amígdala ($p > 0,30$), após a análise de regressão controlando: gênero, regime de drogas antiepiléticas, níveis de glicose plasmática, frequência mensal de crises e tempo de congelamento das amostras.

^b Imunoconteúdo do GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) determinado por western blot;

^c Imunoconteúdo do GluR1 (*glutamate receptor sub-unit 1*) determinado por western blot.

* razão entre a densidade óptica (DO) da banda de proteína / DO da banda de β -actina.

5.3 CAPÍTULO III - Associação entre a Frequência se Crises Epiléticas e a Atividade Enzimática dos Complexos da Cadeia Respiratória em Estruturas do Lobo Temporal de Pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose do Hipocampo

A associação entre a frequência de crises convulsivas e os níveis de atividade da cadeia respiratória mitocondrial no córtex temporal, hipocampo e amígdala dos pacientes com ELTM-HS resistentes aos medicamentos são apresentados na tabela 9.

Houve uma associação positiva significativa entre a atividade da succinato-desidrogenase e a frequência de crises convulsivas no córtex temporal. Na amígdala, houve uma tendência ($p = 0,09$) em direção a uma associação positiva entre o complexo II e frequência de crises.

Os resultados não foram significativos ($p > 0,30$) após correção para as variações dos parâmetros clínicos e trans-operatórias. A probabilidade de uma falta de associação é ainda maior se um nível mais baixo de "p" é aplicado, considerando as comparações múltiplas que foram realizadas.

Tabela 9 - Análise univariada da associação entre a frequência de crises convulsivas mensais e os parâmetros da respiração mitocondrial na amígdala, hipocampo e córtex temporal de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo resistentes a medicações orais

Áreas cerebrais	r	r²	B	Valor de "p"
Córtex Temporal				
Complexo I	0,16	0,03	2,54	0,43
Complexo II	0,03	0,001	- 0,001	0,90
Succinato-Desidrogenase	0,39	0,15	0,05	0,05*
Complexo IV	0,09	0,009	- 0,02	0,65
Hipocampo				
Complexo I	0,22	0,05	- 1,8	0,25
Complexo II	0,08	0,007	0,002	0,68
Succinato-Desidrogenase	0,001	0,01	0,000	0,94
Complexo IV	0,02	0,000	- 0,002	0,93
Amígdala				
Complexo I	0,002	0,000	0,19	0,94
Complexo II	0,36	0,13	0,01	0,09*
Succinato-Desidrogenase	0,24	0,06	0,02	0,28
Complexo IV	0,17	0,03	0,01	0,44

*Estas associações não foram estatisticamente significativas ($p > 0,30$) após a correção para outros fatores clínicos e transoperatórios.

6 DISCUSSÃO

6.1 CAPÍTULO I - Atividade Enzimática dos Complexos da Cadeia Respiratória Mitocondrial em Tecido Cerebral Humano Congelado: Implicações Metodológicas da Coleta e Armazenamento das Amostras

Nós avaliamos a associação entre o tempo desde a anestesia até a coleta de tecido cerebral, eletrólitos transoperatórias, gases sanguíneos, hemodinâmica, pH, parâmetros respiratórios e atividades das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial em tecidos do córtex temporal, amígdala e hipocampo de pacientes com ELTM-EH fármaco-resistentes que foram submetidos à cirurgia de epilepsia. A percentagem de saturação de O_2 , o tempo de armazenagem e os níveis de glicose foram preditores negativos para a atividade das enzimas da cadeia respiratória.

A produção de ATP nas mitocôndrias é impulsionado pela fosforilação oxidativa mitocondrial no grupo de complexos proteicos intermembranas que são compostos de cinco complexos de multi-subunidades (complexo I a V). Os complexos I e II são alimentados com os elétrons transportados pelo NADH e $FADH_2$, coenzimas que são formados principalmente ao nível do ciclo de Krebs. Estes são então transferidos para o complexo III pelo transportador lipídico de elétrons (coenzima Q ou ubiquinona) e, em seguida, para o citocromo c e para o complexo IV, onde finalmente, participa da geração do O_2 .

A energia redox libertada durante o processo de transferência de elétrons nos complexos I, III e IV é usada para bombear ativamente o íon H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso. Isto gera um gradiente eletroquímico de H^+ através da membrana interna que é posteriormente utilizado pelo complexo V para produzir o ATP (Nicholls et al, 2002).

A redução parcial de O_2 também ocorre durante esta respiração aeróbia (até 2-5%) como um processo fisiológico e forma espécies reativas de oxigênio (ROS). Complexos I e III têm sido referidos como sendo os principais locais de geração de ROS nas mitocôndrias sob condições fisiológicas (Boveris et al, 1976; Chen et al, 2003). Também, maior produção de ROS é

esperada quando estes centros redox são comprometidos (Turrens et al 1980; Turrens et al 1997). Por outro lado, níveis mais baixos de formação de ROS poderiam ser esperados em estados de menor disponibilidade de oxigênio tecidual (baixos níveis de PO_2 e saturação de O_2).

Abaixo do limite fisiológico de disponibilização de O_2 , a maioria das células podem ser expostas à condições de hipóxia. Esta, desencadeia imediatamente a ativação de outras rotas energéticas dependentes da AMPc visando a manutenção dos níveis celulares de ATP, como exemplo, a ativação da glicólise. Isto mudaria o fenótipo da bioenergética cerebral. Sob exposições à baixas concentrações de O_2 , as células ativam mecanismos adicionais de adaptação aumentando a estimulação de fatores induzidos por hipóxia. Assim, há a redução do metabolismo oxidativo mitocondrial e da atividade das enzimas da cadeia respiratória. Portanto, níveis de PO_2 e de saturação de oxigênio são parâmetros muito sensíveis (aqui mostrados com uma associação negativa) que devem ser considerados quando a bioenergética no cérebro humano é avaliada.

O tempo de armazenamento foi negativamente correlacionado com a atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial. Esta associação foi anteriormente demonstrada no cérebro humano em amostras de autópsia (Navarro et al, 2009). Neste estudo, uma redução de 75% na atividade mitocondrial foi observada em um tempo de dez horas de congelação *post-mortem*. Embora os autores não descrevam quanto tempo as amostras foram armazenadas, eles concluem que um tempo *post-mortem* de três horas de congelação levou a uma diminuição de 40% na atividade mitocondrial em comparação com amostras “frescas” de tecido cerebral de ratos.

Em nosso estudo, utilizando uma comparação semelhante ao estudo do Navarro et al, as atividades do complexo I das amostras cerebrais humanas foram semelhantes às amostras de córtex cerebral congeladas de ratos adultos (atividade do complexo I foi 720 ± 110 nmol/min/mg de proteína) que permaneceram em freezer a -86°C , durante 7 dias (dados não mostrados). No entanto, não realizamos a avaliação da atividade deste complexo para intervalos de tempo de congelamento diferentes. Esta variável pode levar a degradação de muitas proteínas mitocondriais, como descrito previamente (Ferrer et al, 2008). Portanto, isso pode sugerir a necessidade de uma

obtenção de amostras com o cuidado de armazenamento e registro de tempo em freezer em estudos envolvendo análise neuroquímica que pode ser direta ou indiretamente afetados pela atividade mitocondrial em tecido cerebral.

A média da pressão arterial, hemoglobina e tempo de anestesia até a obtenção da amostragem de tecido foram preditores positivos de atividades enzimáticas. A redução da PAM e da hemoglobina estão diretamente envolvidos com o fornecimento de sangue aos tecidos e, como consequência, um menor fornecimento de nutrientes e oxigênio para a produção de energia mitocondrial. Em nossos pacientes, esses parâmetros foram mantidos perto do intervalo fisiológico normal, mas os resultados sugerem que pequenas mudanças fora da faixa da normalidade são negativamente associada à atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial.

O tempo de anestesia até a coleta das amostras cerebrais também mostraram uma correlação positiva com as atividades das enzimas mitocondriais no córtex cerebral (complexo I, II e succinato-desidrogenase), amígdala (complexo IV) e hipocampo (Complexo II). Isto sugere um efeito hipermetabólico dependente do tempo da anestesia nos nossos pacientes. De forma interessante, uma análise *in vitro* demonstrou que o isoflurano (1 e 2 CAM) pode agir como um inibidor metabólico por induzir despolarização das mitocôndrias pré-sinápticas através da inibição da cadeia de transporte de elétrons (Bains et al, 2006). No entanto, em nossos pacientes o tempo médio de anestesia com isoflurano (0,5-0,6 CAM) foi 188 min para as amostras do córtex e 255 minutos para as da amígdala e do hipocampo. O tempo diferente de exposição ao isoflurano pode explicar os resultados contraditórios entre o nosso estudo e os relatados por Bains et al.

O tempo da última crise convulsiva até a coleta da amostra cerebral mostrou uma associação negativa com a atividade mitocondrial do complexo I no hipocampo e uma associação positiva do mesmo complexo na amígdala. Esta dissociação entre as duas estruturas (amígdala e hipocampo) sugere que o tempo entre as crises convulsiva pode ter um efeito metabólico nestas estruturas límbicas. Embora as crises convulsivas possam se iniciar ou propagar para a amígdala, o hipocampo é considerado a zona primária epileptogênica em pacientes com ELTM-EH fármaco-resistentes (Velasco et al, 2006). A perda

neuronal e a gliose também são particularmente mais intensas no hipocampo (Thom et al, 2010; Araújo et al, 2006). Analisadas em conjunto, essas diferenças histológicas e funcionais entre amígdala e hipocampo podem explicar a associação oposta na atividade do complexo I nestas estruturas.

A relação entre a variação da atividade enzimática do complexo I, o intervalo de tempo entre as crises convulsivas e as comorbidades psiquiátricas é um ponto importante a ser investigado, principalmente devido ao papel da amígdala e do hipocampo sobre os transtornos de humor (Mula et al, 2009; Bragatti et al, 2014; Wingenfeld et al, 2014). Além disso, em estudos experimentais (Wingenfeld et al, 2014; Jerusalinsky et al, 1994) e clínicos (Markowitsch et al, 2012) a associação entre as atividades das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial na amígdala e no hipocampo e o desempenho cognitivo, com foco especial na memória declarativa, também merece uma avaliação mais aprofundada.

Em suma, as atividades das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial em amostras de cérebro humano recolhidas durante procedimento neurocirúrgico pode ser significativamente ($p < 0,05$) afetadas pelo tempo de armazenamento das mesmas. As atividades também são afetadas por parâmetros hemodinâmicos e laboratoriais transoperatórios. Estes parâmetros podem estar associados de forma diferente nas atividades mitocondriais entre as estruturas cerebrais analisadas. Compreender e controlar esses possíveis vieses de confusão durante estudos envolvendo amostras cerebrais é fundamental para a realização de pesquisas reprodutíveis e de alto impacto. Além disso, a implementação de esquemas de amostragem uniformes facilitará a investigação translacional em neuroquímica aplicada.

6.2 CAPÍTULO II - Efeito de uma Dose Única de Dexametasona Sobre a Atividade Enzimática dos Complexos da Cadeia Respiratória Mitocondrial do Córtex, Amígdala e Hipocampo de Pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose do Hipocampo

Em nosso estudo, uma única dose endovenosa de dexametasona (média de 0,17 mg /kg) não afetou significativamente a atividade enzimática do complexo I, II, IV e SDH analisados 3 a 4 horas após a administração do

glicocorticoide no tecido do córtex temporal, na amígdala e no hipocampo ressecados durante neurocirurgia de pacientes com ELTM-EH não compensados clinicamente.

Foi observada uma tendência para um nível mais alto dos níveis de glicose no soro, sugerindo que poderia ser um efeito metabólico periférico da dexametasona, uma vez que este glicocorticoide tem efeitos anti-insulínicos.

A ausência de efeito significativo da dexametasona sobre os parâmetros mitocondriais avaliados pode ser, pelo menos em parte, devido ao curso de tempo relativamente curto após a administração da dexametasona para um efeito genômico mediado por receptores de glicocorticoides nas estruturas cerebrais estudadas. Considerando o efeito do glicocorticoide, em experiências *in vitro*, sobre os receptores mineralocorticoides nos neurônios corticais de ligação de membrana, um curso de tempo maior que 1 hora é necessário para induzir mudanças relacionadas não-genômicas sobre os parâmetros mitocondriais (Du et al, 2009). No entanto, a atividade mineralocorticoide de dexametasona é muito pequena e um efeito de ligação de membrana não-genômico pode ser menos provável (Schimmer et al, 2001). O efeito detalhado da dexametasona na respiração mitocondrial de estruturas corticais e límbicas é um ponto importante a ser investigado.

Batandier e colaboradores recentemente demonstraram mudanças na função mitocondrial cerebral de ratos submetidos a estresse induzido. O estresse retardou em 43% a abertura dos poros de transição de permeabilidade (PTP) e resultou numa ligeira inibição do complexo I da cadeia respiratória. No entanto, a utilização de glicocorticoides não modificou a abertura dos PTP. Estes dados poderiam sugerir um mecanismo de adaptação rápida das mitocôndrias cerebrais em condições de estresse, com um foco especial sobre a regulamentação dos PTP (Batandier et al, 2014).

Em nosso estudo, a administração de dexametasona se sobrepõe ao pico fisiológico do cortisol baseado no ritmo circadiano (Vegiopoulos et al, 2007) e associado ao medo e às lesões físicas relacionadas com a própria cirurgia (Rodrigues et al, 2009; Oakeley et al, 2011). Tem sido demonstrado que 60-90% dos pacientes com epilepsia do lobo temporal tem hipometabolismo interictal determinado pelo tomografia por emissão de pósitrons com [18F] fluordeoxiglicose (FDG-PET),

mesmo na ausência de esclerose do hipocampo. Embora a associação entre o hipometabolismo de FDG-PET e a perda de células neuronais tem sido descrito, uma alteração seletiva no metabolismo energético neuronal (CA3 mas não outros subcampos do hipocampo) parece ser fator de contribuição mais forte do que a contagem de células neuronais (Vielhaber et al, 2003). A relação entre o hipometabolismo temporal dos pacientes com ELTM-EH e o mecanismo adaptativo às reações induzidas por estresse das mitocôndrias de tecido cerebral de ratos descritos por Batandier et al é desconhecida (Batandier et al, 2014).

Considerando-se a oxidação da glicose sobre as diferentes subcamadas do hipocampo (Vielhaber et al, 2003), a ausência de efeito sobre as atividades da dexametasona nos complexos de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial não exclui a possibilidade de uma diferença de efeitos hormonais através das sub-regiões que não poderiam ser detectadas quando a amostra total foi homogeneizada para a análise. Esta hipótese merece mais investigações.

O leitor deve estar ciente das possíveis limitações relacionadas com o poder estatístico de nossa análise (0,72) para identificar mais de 20% de alterações na atividade enzimática média das enzimas estudadas. Essa limitação não pode ser descrita em nosso estudo porque apenas 10 pacientes foram incluídos antes do início do tratamento com dexametasona e a enzimologia e técnicas de Western Blot limitam o número de amostras analisáveis. No entanto, a plausibilidade biológica com base no efeito agudo robusto observado (em horas) da corticosterona na oxidação mitocondrial, potencial de membrana e capacidade de retenção de cálcio em neurónios corticais de cultura (Du et al, 2009) faz com que a possibilidade de erro Tipo II seja mais remoto.

6.3 CAPÍTULO III - Associação entre a Frequência de Crises Epilépticas e a Atividade Enzimática dos Complexos da Cadeia Respiratória em Estruturas do Lobo Temporal de Pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose do Hipocampo

Os resultados sugerem que a respiração mitocondrial interictal nas estruturas estudadas não foram significativamente

afetadas pelas variações das freqüências mensais de crises convulsivas neste grupo de pacientes (média de 8 crises convulsivas mensais, com mínimo de 1 e um máximo de 30).

O desenho do estudo não permite conclusões detalhadas sobre o papel da atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial na epileptogênese e ictogênese dos pacientes com ELTM-EH.

Não podemos generalizar os resultados encontrados neste estudo para outras síndromes epilépticas ou pacientes com ELTM-EH e uma menor freqüência de crises. Os possíveis mecanismos envolvidos nas adaptações das atividades das enzimas mitocondriais a variabilidade freqüência das crises em pacientes ELTM-EH resistentes aos medicamentos necessita maiores investigações.

7 CONCLUSÃO

Parâmetros hemodinâmicos e laboratoriais intraoperatórios, bem como o intervalo de tempo desde a última crise convulsiva até a obtenção de tecido cerebral e o intervalo tempo do seu armazenamento até que a análise bioquímica influenciam as atividades das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial em amostras humanas de córtex, amígdala e hipocampo. Essas variáveis precisam ser controladas para se evitar viés de confusão em estudos utilizando amostras de cérebro humano recolhidos em neurocirurgia eletiva.

Em condições cirúrgicas estressantes a administração de dose farmacológica única de dexametasona não causa mudanças significativas nas atividades enzimáticas média do complexo I, II, IV e SDH no córtex, amígdala e cabeça do hipocampo de indivíduos adultos com ELTM-EH. Os resultados sugerem a existência de uma resistência natural ou um mecanismo de adaptação rápida para o glicocorticoide nos complexos de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial em estruturas límbicas e córtex de pacientes com ELTM-EH.

A respiração mitocondrial interictal nas estruturas estudadas não foi significativamente afetadas pelas variações das freqüências mensais de crises epilépticas nos pacientes com ELTM-EH em nosso estudo.

Os nossos resultados são relevantes para entender a função mitocondrial cerebral durante estados de estresse agudo em pessoas saudáveis, bem como em pacientes com doenças neuropsiquiátricas.

APOIO:

Projeto NENASC do Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) , Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC) .

9 REFERENCIAS

- Abosch A, Bernasconi N, Boling W, Jones-Gotman M, Poulin N, Dubeau F, et al. Factors predictive of suboptimal seizure control following selective amygdalohippocampectomy. **Journal of neurosurgery**. 2002;97(5):1142-51.
- Aguilera G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. **Front Neuroendocrinol** 1994; 15:321.
- Alexandre V, Jr., Walz R, Bianchin MM, Velasco TR, Terra-Bustamante VC, Wichert-Ana L, et al. Seizure outcome after surgery for epilepsy due to focal cortical dysplastic lesions. **Seizure**. 2006;15(6):420-7.
- Antoni FA. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. **Endocr Rev** 1986; 7:351.
- Araujo D, Santos AC, Velasco TR, Wichert-Ana L, Terra-Bustamante VC, Alexandre V, Jr., et al. Volumetric evidence of bilateral damage in unilateral mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**. 2006;47(8):1354-9.
- Babcock GT, Wikstrom M. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. **Nature**. 1992;356(6367):301-9.
- Bains R, Moe MC, Larsen GA, Berg-Johnsen J, Vinje MJ, Volatile anaesthetics depolarize neural mitochondria by inhibition of the electron transport chain. **Acta Anaesthesiol Scand**. 2006; 50: 572-579.
- Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rotig A, Rustin P, Tzagoloff A (2002) Cytochrome oxidase in health and disease. **Gene** 286:53-63.
- Batandier C, Poulet L, Hininger I, Couturier K, Fontaine E, Roussel AM, et al. Acute stress delays brain mitochondrial permeability transition pore opening. **Journal of neurochemistry**. 2014;131(3):314-22.

- Berardelli R, Karamouzis I, D'Angelo V, et al. Role of mineralocorticoid receptors on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in humans. **Endocrine** 2013; 43:51.
- Bragatti JA, Torres CM, Cherubini PA, Leistner-Segal S, Bianchin MM. Is interictal EEG activity a biomarker for mood disorders in temporal lobe epilepsy?, **Clin Neurophysiol.** 2014;125: 1952-1958.
- Bornstein SR, Chrousos GP. Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism.** 1999;84(5):1729-36.
- Bourdeau I, Bard C, Forget H, et al. Cognitive function and cerebral assessment in patients who have Cushing's syndrome. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2005; 34:357.
- Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem J.** 1976;156: 435-444.
- Buckley TM, Schatzberg AF. On the interactions of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sleep: normal HPA axis activity and circadian rhythm, exemplary sleep disorders. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism.** 2005;90(5):3106-14.
- Bujarski KA, Hirashima F, Roberts DW, Jobst BC, Gilbert KL, Roth RM, et al. Long-term seizure, cognitive, and psychiatric outcome following trans-middle temporal gyrus amygdalohippocampectomy and standard temporal lobectomy. **Journal of neurosurgery.** 2013;119(1):16-23.
- Calloni GW, Penno CA, Cordova FM, Trentin AG, Neto VM, Leal RB. Congenital hypothyroidism alters the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAPK in the hippocampus of neonatal rats. **Brain research Developmental brain research.** 2005;154(1):141-5.

- Capaldi RA. Structure and function of cytochrome c oxidase. **Annu Rev Biochem** 1990;59:569- 596.
- Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of biochemistry and biophysics**. 1996;328(2):309-16.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. **Annual review of physiology**. 2005;67:259-84.
- Chen Q, Vazquez EF, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. **J Biol Chem**. 2003;278:36027-36031.
- Chen YF, Li YF, Chen X, Sun QF. Neuropsychiatric disorders and cognitive dysfunction in patients with Cushing's disease. **Chin Med J (Engl)** 2013; 126:3156.
- Cordova FM, Rodrigues AL, Giacomelli MB, Oliveira CS, Posser T, Dunkley PR, et al. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain research**. 2004;998(1):65-72.
- da Silva TI, Ciconelli RM, Alonso NB, et al. Validity and reliability of the Portuguese version of the quality of life in epilepsy inventory (QOLIE-31) for Brazil. **Epilepsy Behav** 2007;10:234-41.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocr Rev** 1998; 19:269.
- Di Donato S (2000) Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. **Journal of inherited metabolic disease** 23:247-263.

- Diederich S, Eigendorff E, Burkhardt P, et al. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2: an important pharmacokinetic determinant for the activity of synthetic mineralo- and glucocorticoids. **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87:5695.
- Du J, Wang Y, Hunter R, Wei Y, Blumenthal R, Falke C, et al. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2009;106(9):3543-8.
- Engel J, Jr. Surgery for seizures. **The New England journal of medicine**. 1996;334(10):647-52.
- Ferrer I, Martinez A, Boluda S, Parchi P, Barrachina M. Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. **Cell Tissue Bank**. 2008; 9:181-194.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica chimica acta*; **international journal of clinical chemistry**. 1985;153(1):23-36.
- Grillon C, Smith K, Haynos A, Nieman LK. Deficits in hippocampus-mediated Pavlovian conditioning in endogenous hypercortisolism. **Biol Psychiatry** 2004; 56:837.
- Guarnieri R, Walz R, Hallak JE, Coimbra E, de Almeida E, Cescato MP, et al. Do psychiatric comorbidities predict postoperative seizure outcome in temporal lobe epilepsy surgery? **Epilepsy & behavior : E&B**. 2009;14(3):529-34.
- Guarnieri R, Wichert-Ana L, Hallak JE, Velasco TR, Walz R, Kato M, et al. Interictal SPECT in patients with mesial temporal lobe epilepsy and psychosis: a case-control study. **Psychiatry research**. 2005;138(1):75-84.

- Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 1999; 39:1.
- Harris HJ, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR, Holmes MC. Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11b-hydroxysteroid dehydrogenase (11b-HSD)-1 plays a key role in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: analysis of 11b-HSD-1-deficient mice. **Endocrinology**. 2001;142: 114–120.
- Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM. Effects of glucocorticoids on gene transcription. **European journal of pharmacology**. 2004;500(1-3):51-62.
- Holmes MC, Yau JL, Kotelevtsev Y, et al. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the brain: two enzymes two roles. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 1007:357.
- Jameison K, Dinan TG. Glucocorticoids and cognitive function: from physiology to pathophysiology. **Hum Psychopharmacol** 2001; 16:293.
- Jamieson PM, Fuchs E, Flugge G, Seckl JR. Attenuation of hippocampal 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by chronic psychosocial stress in the tree shrew. **Stress**. 1997; 2: 123–132.
- Jerusalinsky D, Quillfeldt JA, Walz R, Da Silva RC, Bueno e Silva M, Bianchin M, Schmitz P, Zanatta MS, Ruschel AC, Paczko N. Effect of the infusion of the GABA-A receptor agonist, muscimol, on the role of the entorhinal cortex, amygdala, and hippocampus in memory processes. **Behav Neural Biol**. 1994; 61:132-138.
- Josephson CB, Dykeman J, Fiest KM, et al. Systematic review and meta-analysis of standard vs selective temporal lobe epilepsy surgery. **Neurology** 2013; 80:1669.
- Judd LL, Schettler PJ, Brown ES, Wolkowitz OM, Sternberg EM, Bender BG, et al. Adverse consequences of glucocorticoid medication: psychological, cognitive, and behavioral effects. **The American journal of psychiatry**. 2014;171(10):1045-51.

- Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends in pharmacological sciences**. 2013;34(9):518-30.
- Kennedy EP, Lehninger AL (1950) The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria. **The Journal of biological chemistry** 185:275-285.
- Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. Williams **Tratado de Endocrinologia**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2010.
- Lamberts SW, Bruining HA, de Jong FH. Corticosteroid therapy in severe illness. **N Engl J Med** 1997; 337:1285.
- Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, Schuck PF, Scussiato K, Sarkis JJ, et al. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. **Molecular genetics and metabolism**. 2005;86(1-2):188-99.
- Leal RB, Goncalves CA, Rodnight R. Calcium-dependent phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the rat hippocampus: a comparison of the kinase/phosphatase balance in immature and mature slices using tryptic phosphopeptide mapping. **Brain research Developmental brain research**. 1997;104(1-2):1-10.
- Lehninger AL, Smith SW (1949) Efficiency of phosphorylation coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen. **The Journal of biological chemistry** 181:415-429.
- Lopes MW, Soares FM, de Mello N, Nunes JC, Cajado AG, de Brito D, et al. Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy. **Experimental brain research**. 2013;226(2):153-63.
- Lopes MW, Soares FM, de Mello N, Nunes JC, de Cordova FM, Walz R, et al. Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemical research**. 2012;37(9):1868-78.

- Low SC, Moisan MP, Noble JM, Edwards CR, Seckl JR. Glucocorticoids regulate hippocampal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity and gene expression in vivo in the rat. **J Neuroendocrinol.** 1994; 6: 285–290.
- Lupien SJ, Maheu F, Tu M, et al. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. **Brain Cogn** 2007; 65:209.
- Maheu FS, Mazzone L, Merke DP, et al. Altered amygdala and hippocampus function in adolescents with hypercortisolemia: a functional magnetic resonance imaging study of Cushing syndrome. **Dev Psychopathol** 2008; 20:1177.
- Markowitsch HJ, Staniloiu A. Amnesic disorders. **Lancet.** 2012; 380:1429-1440.
- McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. **Neuropharmacology.** 2012;62(1):3-12.
- McEwen BS, Magarinos AM. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. **Hum. Psychopharmacol.** 2001, 16: S7–S19.
- Mirescu C, Peters JD, Noiman L, Gould E. Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006; 103:19170.
- Monder C, Sakai RR, Miroff Y, Blanchard DC, Blanchard RJ. Reciprocal changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: evidence for a mediating role of testicular 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. **Endocrinology.** 1994;134: 1193–1198.
- Mula M, Monaco F. Antiepileptic drugs and psychopathology of epilepsy: an update. **Epileptic Disord.** 2009; 11:1-9.

- Navarro A, Boveris A, Bandez MJ, Sanchez-Pino MJ, Gomez C, Muntane G, Ferrer I. Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies. **Free Radic Biol Med.** 2009; 46:1574-1580.
- Nelson D, Cox MM (2004) **Principles of Biochemistry.** 698.
- Nicholls DG, Ferguson SJ. Bioenergetics 3. **Academic Press,** London, 2002.
- Nunes JC, Zakon DB, Claudino LS, Guarneri R, Bastos A, Queiroz LP, et al. Hippocampal sclerosis and ipsilateral headache among mesial temporal lobe epilepsy patients. **Seizure.** 2011;20(6):480-4.
- Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. The **Journal of biological chemistry.** 2011;286(5):3177-84.
- Pandya JD, Agarwal NA, Katyare SS. Dexamethasone treatment differentially affects the oxidative energy metabolism of rat brain mitochondria in developing and adult animals. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience.* 2007;25(5):309-16.
- Pauli C, Thais ME, Claudino LS, Bicalho MA, Bastos AC, Guarneri R, et al. Predictors of quality of life in patients with refractory mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsy & behavior : E&B.** 2012;25(2):208-13.
- Pelletier G, Luu-The V, Li S, Bujold G, Labrie F. Localization and glucocorticoid regulation of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA in the male mouse forebrain. **Neuroscience.** 2007;145: 110–115.
- Perneger TV. What's wrong with Bonferroni adjustments. **Bmj.** 1998;316(7139):1236-8.

- Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical biochemistry**. 1977;83(2):346-56.
- Poyton RO, McEwen JE (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. **Annu Rev Biochem** 65:563-607.
- Posser T, de Aguiar CB, Garcez RC, Rossi FM, Oliveira CS, Trentin AG, et al. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. **Archives of toxicology**. 2007;81(6):407-14.
- Rajan V, Edwards CR, Seckl JR. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in cultured hippocampal cells reactivates inert 11-dehydrocorticosterone, potentiating neurotoxicity. **J Neurosci** 1996; 16:65.
- Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM. The influence of stress hormones on fear circuitry. **Annual review of neuroscience**. 2009;32:289-313.
- Rowley S, Patel M. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. **Free radical biology & medicine**. 2013;62:121-31.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**. 1994;228(1):35-51.
- Santos IN, Sumitame M, Caceres VM, Moreira MF, Krieger MH, Spadari-Bratfisch RC. Evidence for two atypical conformations of beta-adrenoceptors and their interaction with Gi proteins. **European journal of pharmacology**. 2005;513(1-2):109-18.
- Sagher O, Thawani JP, Etame AB, Gomez-Hassan DM. Seizure outcomes and mesial resection volumes following selective amygdalohippocampectomy and temporal lobectomy. **Neurosurgical focus**. 2012;32(3):E8.

- Saraste M (1990) Structural features of cytochrome oxidase. **Q Rev Biophys** 23:331-366.
- Schimmer BP, Parker KL. Adrenocorticotrophic hormone: Adrenocortical steroids and their synthetic analogs. Inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: Hardman JG LL, editor. Goodman and Gilman's: **The Pharmacological Basis Of Therapeutics**. Tenth Edition. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Seckl JR, Walker BR. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a modulator of glucocorticoid action: from metabolism to memory. **Trends Endocrinol Metab** 2004; 15:418.
- Smoak KA, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. **Mechanisms of ageing and development**. 2004;125(10-11):697-706.
- Sivitz WI, Yorek MA (2010) Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal** 12:537-577.
- ter Heegde F, De Rijk RH, Vinkers CH. The brain mineralocorticoid receptor and stress resilience. **Psychoneuroendocrinology**. 2015;52:92-110.
- Thom M, Mathern GW, Cross JH, Bertram EH. Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome? **Ann Neurol** . 2010; 68:424-434.
- Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosci Rep**. 1997; 17:3-8.
- Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J**. 1980; 191:421-427.
- Usui N, Baba K, Matsuda K, Tottori T, Terada K, Usui K, et al. Mesial temporal lobe epilepsy with no specific histological abnormality: a distinct surgically remediable syndrome. **Epilepsy & behavior : E&B**. 2013;29(3):542-7.

- Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. **Molecular and cellular endocrinology**. 2007;275(1-2):43-61.
- Velasco TR, Sakamoto AC, Alexandre V, Walz R, Dalmagro CL, Bianchin MM, Araujo D, Santos AC, Leite JP, Assirati JA, Carlotti C. Foramen ovale electrodes can identify a focal seizure onset when surface EEG fails in mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**. 2006; 47:1300-1307.
- Vielhaber S, Von Oertzen JH, Kudin AF, Schoenfeld A, Menzel C, Biersack HJ, et al. Correlation of hippocampal glucose oxidation capacity and interictal FDG-PET in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**. 2003;44(2):193-9.
- Voet D, Voet JD (1995) **Biochemistry**. New York: John Wiley & sons, Inc.
- Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science** 283:1482-1488.
- Watson S, Gallagher P, Del-Estal D, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with chronic depression. **Psychol Med** 2002; 32:1021.
- Webster JC, Huber RM, Hanson RL, et al. Dexamethasone and tumor necrosis factor-alpha act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types. **Endocrinology** 2002; 143:3866.
- Wieser HG and ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Epilepsia** 2004; 45 (6): 695-714.
- Williams GH. Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. **Heart failure reviews**. 2005;10(1):7-13.
- Wingenfeld K, Wolf OT, Stress, memory, and the hippocampus. **Front Neurol Neurosci**. 2014; 34: 109-120.
- Young EA, Lopez JF, Murphy-Weinberg V, et al. Hormonal evidence for altered responsiveness to social stress in major depression. **Neuropsychopharmacology** 2000; 23:411.

APÊNDICE A- INSTRUMENTO DE COLETA

Nome do Paciente:

Sexo: () M () F

Data de Nascimento:

Cirurgia:

Peso:

Registro:

Data da

PRÉ-OPERATÓRIO

Carbamazepina () Horários que

recebeu: _____

Fenitoína () Horários que

recebeu: _____

Fenobarbital () Horários que

recebeu: _____

Ácido Valpróico Horários que

recebeu: _____

Hidantalização na noite anterior () Sim 20 mg/kg () Não -
Usava Hidantal - 250mg noite anterior

Dexametasona 10 mg () Kefazol 1 grama () ou
outro ATB _____ dose: _____

Propofol 2 mg/kg () sim () não Outra dose ?

Rocurônio – 0,5 a 0,9 mg/kg () sim () não Fentanil
1-2 mg/kg () sim () não

MANUTENÇÃO:

SF 0.9% 1,2 ml/kg/h + ½ da diurese Remifentanil 0,1 - 0,2
ug/km/min Isoflurano 0,5- 0,6 CAM

<p>Horário da Indução Anestésica: _____</p> <p>Horário da Abertura da Duramáter: _____</p> <p>Horário da Retirada de Neocortex _____</p> <p>Horário da Coagulação vasos do HIP: _____</p> <p>Horário da Retirada do HIP _____</p> <p>Horário da retirada da AMI _____</p> <p>Horário da Coleta da Gasometria: _____</p> <p>Horário da realização da Gasometria: _____</p> <p>Coleta Gaso: _____</p> <p>Realização: _____</p>	<p>GASOMETRIA Coagulação dos Vasos do Hipocampo</p> <p>PAM: _____ FC: _____ FR: _____</p> <table border="1"> <tr><td>pH</td><td>Glicose</td></tr> <tr><td>PCO2</td><td>Na⁺⁺</td></tr> <tr><td>PO2</td><td>K⁺</td></tr> <tr><td>HCO3</td><td>Ca⁺⁺</td></tr> <tr><td>CO2Total</td><td>Cl⁻</td></tr> <tr><td>E.B.</td><td>Mg⁺⁺</td></tr> <tr><td>Sat O2</td><td>Ht</td></tr> <tr><td>Ác. Láctico</td><td>Hb</td></tr> </table>	pH	Glicose	PCO2	Na ⁺⁺	PO2	K ⁺	HCO3	Ca ⁺⁺	CO2Total	Cl ⁻	E.B.	Mg ⁺⁺	Sat O2	Ht	Ác. Láctico	Hb
pH	Glicose																
PCO2	Na ⁺⁺																
PO2	K ⁺																
HCO3	Ca ⁺⁺																
CO2Total	Cl ⁻																
E.B.	Mg ⁺⁺																
Sat O2	Ht																
Ác. Láctico	Hb																
<p style="text-align: center;">DATA</p> <p>Última Aura: _____</p> <p>Penúltima Aura: _____</p> <p>Última Crise Parcial Complexa: _____</p> <p>Penúltima Crise Parcial Complexa: _____</p> <p>Início da Última Menstruação: _____</p> <p>Término da Última Menstruação: _____</p>	<p style="text-align: center;">HORA</p> <p>Última Aura: _____</p> <p>Penúltima Aura: _____</p> <p>Última Crise Parcial Complexa: _____</p> <p>Penúltima Crise Parcial Complexa: _____</p> <p>Usa ACO () Sim () Não</p> <p>Qual o ACO? _____</p>																

OBSERVAÇÕES:

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UFSC

**Universidade Federal de Santa Catarina
Hospital Universitário (HU-UFSC)
Campus Universitário - Trindade - Florianópolis-SC**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: MARCADORES DE POTENCIAÇÃO SINÁPTICA E MECANISMOS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NA EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL ASSOCIADA À ESCLEROSE DO HIPOCAMPO

Eu, _____, _____
anos, concordo em participar no projeto de pesquisa conduzido por Dr. Roger Walz, Dr. Marcelo Neves Linhares, Dr. Rodrigo Leal, Dr. Ricardo Guarnieri, Dra. Kátia Lin. Este projeto de pesquisa tem como objetivo estudar os marcadores de potenciação e despotenciação sináptica e os mecanismos de transdução de sinal associados à epilepsia de lobo temporal associada à esclerose do hipocampo (ELTM-EH). Este estudo será realizado no hipocampo e neocórtex de pacientes com ELTM-EH, com epilepsia de difícil controle, que foram submetidos a lobectomia temporal anterior-mesial. Este procedimento já é mundialmente reconhecido, beneficiando mais de 70% dos pacientes com ELTM-EH.

Procedimento a ser seguido:

Protocolo de avaliação pré-cirúrgica do CEPESC, semelhante ao previamente descrito na literatura, incluindo vídeo-eletroencefalograma (VEEG), ressonância nuclear magnética (RNM), avaliação neuropsicológica, psiquiátrica e social. A técnica cirúrgica de lobectomia temporal anterior-mesial clássica consiste na retirada do hipocampo (HIP), parte da amígdala e neocórtex temporal no limite posterior de até 4 cm do polo temporal. Após a craniotomia, abertura da meninge e

delimitação da área de ressecção serão obtidas amostras do terço anterior e no limite posterior da ressecção do neocórtex temporal, parte da cabeça do hipocampo e metade da amígdala, já rotineiramente ressecados para o tratamento. O restante do material (neocórtex e corpo e cauda do hipocampo) será enviado para estudo anatomopatológico de rotina, incluindo avaliação da perda neuronal e brotamentos sinápticos no hipocampo além dos estudos de imunoistoquímica deste projeto.

As amostras coletadas durante a cirurgia, serão congeladas em nitrogênio líquido e depois transferidas para Freezer -70°C onde permanecerão armazenadas até a realização dos estudos neuroquímicos.

Serão coletadas amostras de neocórtex temporal de um paciente, que após homogeneização, serão divididas em várias alíquotas que servirão de controle interno para os experimentos de neuroquímica realizados em dias diferentes, evitando assim variações intrínsecas ocorridas pela realização dos ensaios em dias diferentes. O mesmo será realizado no caso das reações de imonoistoquímica.

Todas as variáveis relacionadas ao procedimento cirúrgico e anestésico serão controladas e os procedimentos realizados sistematicamente de forma semelhante em cada um dos pacientes através de protocolo pré-estabelecido.

Riscos e desconfortos:

Quanto aos relacionados à obtenção das amostras, há indicação de tratamento cirúrgico destes pacientes, com remoção dos tecidos envolvidos, não havendo danos para o paciente

Custo: Não haverá custo para os pacientes que participarem deste projeto de pesquisa.

Sigilo: Toda informação obtida não será fornecida a pessoas não envolvidas neste projeto de pesquisa sem consentimento. Seu nome jamais será utilizado em trabalhos científicos ou apresentações em congressos/simpósios, ou seja, fica assegurado o anonimato da identidade.

Liberdade do paciente: A participação neste projeto de pesquisa é voluntária e o paciente não receberá nenhuma remuneração. O paciente poderá recusar-se a participar ou

retirar-se do projeto em qualquer momento sem penalidades ou suspensão do acompanhamento médico.

Consentimento pós esclarecimento: Declaro que _____ me esclareceu sobre todos os itens acima. Eu livremente concordo em participar deste projeto de pesquisa e declaro que recebi uma cópia deste consentimento. Caso eu necessite de qualquer informação adicional sobre a minha participação neste projeto eu poderei contatar o Dr. Roger Walz.

Voluntário (nome, assinatura e data)

Pesquisador Responsável (nome, assinatura e data)

Testemunha da assinatura voluntária do paciente

ANEXO A – ESCALA QOLIE31

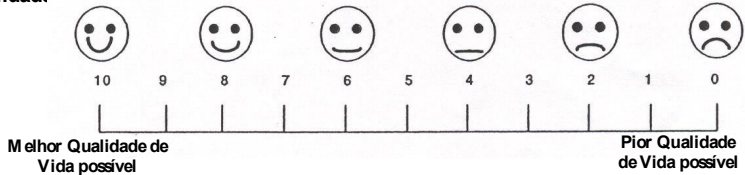
QOLIE – 31 (Quality of Life in Epilepsy Inventory)

Nome: _____

Prontuário: _____

Estas questões são sobre sua saúde e atividades do dia-a-dia. Responda cada questão circulando a resposta que mais se aproxime da forma como está sua saúde. Caso não esteja seguro da resposta, responda da forma mais honesta possível.

1. Em geral, como você classificaria sua **Qualidade de Vida**? Circule um número na escala que varia de 0 a 10, onde 0 corresponde a **Pior Qualidade de Vida** possível e 10 a **Melhor Qualidade**



As questões seguintes são sobre **como você tem se sentido e como as coisas têm sido para você nas últimas 4 semanas**. Para cada questão indique a resposta que mais se aproxime de **como tem se sentido**. Circule um número na escala que varia de 1 (todo tempo) a 6 (nunca). **Com que frequência, nas últimas 4 semanas, você:**

	Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
2. Sentiu-se cheio de disposição, de ânimo?	1	2	3	4	5	6
3. Sentiu-se muito nervoso?	1	2	3	4	5	6
4. Sentiu-se tão triste que nada o animava?	1	2	3	4	5	6
5. Sentiu-se calmo ou tranqüilo?	1	2	3	4	5	6
6. Sentiu-se cheio de energia?	1	2	3	4	5	6
7. Sentiu-se desanimado ou abatido?	1	2	3	4	5	6
8. Sentiu-se esgotado?	1	2	3	4	5	6
9. Sentiu-se feliz?	1	2	3	4	5	6
10. Sentiu-se cansado?	1	2	3	4	5	6
11. Preocupa-se em ter outra crise?	1	2	3	4	5	6

12. Teve dificuldade de raciocinar e resolver problemas (como fazer planos, tomar decisões, aprender coisas novas)?	1	2	3	4	5	6
13. Você diminuiu suas atividades sociais, como visitar amigos ou parentes próximos por problemas com a sua saúde?	1	2	3	4	5	6

14. Como tem sido sua **Qualidade de Vida nas últimas 4 semanas**, ou seja, **como as coisas têm sido para você?** Circule na escala um número que varia de 1 (excelente) a 5 (péssima).



15. Nas últimas 4 semanas, você teve **problemas com sua memória**, ou seja problemas para lembrar das coisas? Circule um número na escala que varia de 1 (Bastante Problema) a 4 (Nenhum Problema).

Sim, bastante problema	Sim, algum problema	Sim, só um pouco de problema	Não, nenhum problema
1	2	3	4

16. Nas últimas 4 semanas, você teve **problemas com sua memória** (ou seja, lembrar-se das coisas que as pessoas disseram) no seu trabalho ou atividades diárias?

Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
1	2	3	4	5	6

As perguntas seguintes estão relacionadas a **problemas de concentração**. Nas últimas 4 semanas, com que frequência você teve problemas para concentrar-se (ou seja, manter-se pensando em uma determinada atividade) e o quanto esses problemas interferiram no seu dia-dia.

	Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
17. Problemas para concentrar-se durante uma leitura.	1	2	3	4	5	6
18. Problemas para manter sua atenção em alguma atividade por algum tempo?	1	2	3	4	5	6

As questões seguintes relacionam-se com **problemas que a epilepsia ou a medicação** podem ter causado em certas atividades, nas últimas 4 semanas.

	Sim, bastante	Sim, moderadamente	Sim, só um pouco	Sim, às vezes	Não, nenhum
19. No lazer.	1	2	3	4	5
20. Na direção de veículos.	1	2	3	4	5

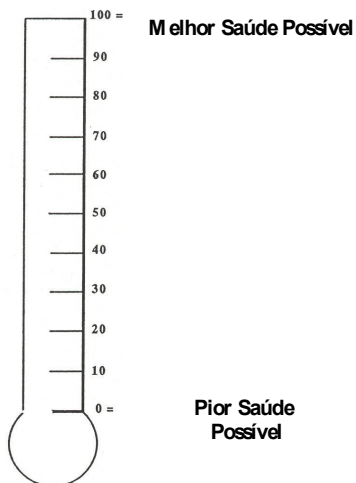
As perguntas seguintes estão relacionadas em **como você tem se sentido em relação às suas crises**

	Sim, bastante	Sim, moderadamente	Sim, só um pouco	Sim, Às vezes	Não, nenhum
21. Você tem medo de ter outra crise nas próximas 4 semanas?	1	2	3	4	5
22. Você se preocupa em machucar-se durante uma crise?	1	2	3	4	5
23. Preocupa-se em se envergonhar ou ter problemas sociais devido a crise?	1	2	3	4	5
24. Você se preocupa pelos efeitos colaterais que a medicação possa lhe causar se tomada por um longo período, ou seja, que ela possa fazer mal para seu organismo?	1	2	3	4	5

Indique o quanto os seguintes problemas abaixo o incomodam. Circule um número na escala que varia de 1 (Não Incomoda) a 5 (Incomoda Extremamente).

	Sim, incomoda extremament e	Sim, incomoda bastante	Sim, incomoda só um pouco	Sim, incomoda às vezes	Não incomoda
25. As crises epilépticas	5	4	3	2	1
26. Problemas de Memória, ou seja, dificuldade para lembrar das coisas.	5	4	3	2	1
27. Dificuldade no trabalho.	5	4	3	2	1
28. Dificuldades sociais, ou seja, sentir-se impedido de se relacionar com outras pessoas ou fazer atividades fora de casa.	5	4	3	2	1
29. Efeitos colaterais da medicação no organismo?	5	4	3	2	1
30. Efeitos colaterais da medicação no raciocínio, para pensar, para se concentrar?	5	4	3	2	1

31. Quanto você acha que sua saúde está boa ou ruim? No termômetro abaixo a **melhor saúde possível** corresponde a **100** e a **pior saúde possível** corresponde a **0**. Circule um número na escala que melhor indica **como você se sente em relação a sua saúde**. Ao responder, **considere a epilepsia** como sendo parte da sua saúde.



ANEXO B – PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

26/10/12

Certificado



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 365

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584 GR 99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 365

FR: 304969

TÍTULO: MARCADORES DE POTENCIAÇÃO SINÁPTICA E MECANISMOS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NA EPILEPSIA DE LOBOTEMPORAL ASSOCIADA A ESCLEROSE DO HIPOCAMPO

AUTOR: Roger Walz, Prof. Dr. Marcelo Neves Linhares, Dr. Rodrigo Leal, Dr. Ricardo Gasmerri, Dra. Kátia Lin, Cláudia Pinto Figueiredo, Psic. Maria Emília Rodrigues de Oliveira Thain, Marcelo Liborio Schwarzbold, Alexandre Paim Diaz, Flávia Mahatma Schneider Soares, Iscláson da Silva Gullo, Cláudia Carvalho Pestana Silva, Melina Most Bercotti, Douglas Afonso Formolo

FLORIANÓPOLIS, 30 de Novembro de 2009.

Coordenador do CEPSH UFSC

ANEXO C – ARTIGO: NEUROPSYCHIATRIC DISEASE AND TREATMENT

ARE MITOCHONDRIAL PARAMETERS IN THE AMYGDALA, HIPPOCAMPUS AND TEMPORAL NEOCORTEX ASSOCIATED WITH SEIZURE FREQUENCY IN DRUG-RESISTANT MESIAL TEMPORAL LOBE EPILEPSY PATIENTS?

Marcelo Fernando Ronsoni,¹ Aline Pertile Remor,² Mark William Lopes,³ Rodrigo Bairy Leal,^{1,3} Marcelo Libório Schwarzbold,¹ Alexandre Ademar Hoeller,¹ Cristiane Ribeiro de Carvalho,¹ Juliana Ben,¹ Marcelo Neves Linhares,^{1,4,5} Kátia Lin,^{1,6} Alexandra Latini,^{1,2} Roger Walz^{1,6}

1. Centro de Neurociências Aplicadas, Hospital Universitário (HU), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil.

2. Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, UFSC; Florianópolis, SC, Brasil.

3. Laboratório de Transdução de Sinal no Sistema Nervoso Central, Departamento de Bioquímica, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

4. Serviço de Cirurgia de Epilepsia, HGCR, Florianópolis, SC, Brasil;

5. Divisão de Neurocirurgia, Departamento de Cirurgia, HU, UFSC; Florianópolis, SC, Brasil;

6. Serviço de Neurologia, Departamento de Clínica Médica, HU, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil;



Back to [Manuscript Status](#)

☰ Sub Menu

Current Files

Sub ID: 91026

Manuscript Title: Are mitochondrial respiration parameters in the amygdala, hippocampus and temporal neocortex associated with seizure frequency in drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy patients?

Journal: Neuropsychiatric Disease and Treatment
|- [Aims and Scope](#)

Author: Dr Ronsoni

Submitted On: 24 Jun 2015

Status: 3B - REPORT: ACCEPT WITH CHANGES

Number of Authors: 12

Files:

[91026 manuscript.docx](#)

June 25
2015

[Download](#)

09:19:43

ABSTRACT

Background: The brain has a very high metabolic rate and the neuronal functions are particularly sensitive to any mitochondrial dysfunction. Experimental and clinical works have suggested that the mitochondria are implicated in epileptogenetic processes in mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampus sclerosis (MTLE-HS). However, the association among mitochondria function and the frequency of seizures in an established drug-resistant MTLE-HS remains unknown.

Method: We studied the association between the mitochondrial respiratory chain complexes enzymatic (MRCCE) activities in the temporal neocortex (Cx), amygdala (AMY) and head of hippocampus (HYP) in human brain tissue and the monthly frequency of seizures of patients (n = 24) who underwent temporal lobectomy.

Results: After a correction for the distribution in the clinical and trans-operative parameters by multiple linear regression analysis the seizure frequency of patients were not independently associated with the MRCCE activities in analyzed structures.

Conclusion: The results suggest the interictal MRCCE activities in temporal lobe structures are not associated with frequency of seizures in drug resistant MTLE-HS. These findings cannot be generalized to all other epileptic syndromes or patients with MTLE-HS and a lower frequency of seizures. Further works are required to clarify the adaptive mechanisms of brain mitochondrial enzymes to seizures in patients with MTLE-HS.

Keywords: Mitochondria respiration; Seizures, Amygdala; Hippocampus; Neocortex;

Introduction

The brain has a very high metabolic rate, and the neuronal functions are particularly sensitive to any mitochondrial dysfunction. The respiratory chain (RC) consists of five enzyme complexes that are distributed in a special way in the inner mitochondrial membrane. The electrons coming from the Krebs cycle and other reactions are catalyzed by dehydrogenases and are transferred to the RC with molecular oxygen as the final acceptor.¹ The mitochondria play an important role in ATP generation, metabolite/neurotransmitter biosynthesis, calcium

homeostasis and apoptosis. They are the primary site of reactive oxygen species (ROS) production.² Experimental and clinical work has suggested that the mitochondria are implicated in the epileptogenesis in mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampus sclerosis (MTLE-HS)² and previous findings demonstrated a specific deficiency of complex I of the mitochondrial respiratory chain in the hippocampal CA3 region in temporal lobe patients (n = 57) comparison to non-epileptic controls (n = 2).³

The MTLE-HS is the most common surgically-remediable epileptic syndrome.⁴ The surgery involves a standard technique of temporal lobe resection that offers an ethical opportunity for mitochondria studies in human epilepsy. We consider the bioenergetic characteristics of epileptic seizures as well as the possible association between epileptic seizures and interictal mitochondrial function. The association between seizure frequency and brain mitochondrial respiratory chain complexes enzymatic (MRCCE) activities in the temporal neocortex (Cx), amygdala (AMY) and hippocampus (HYP) of drug-resistant MTLE-HS is unknown. Here, we measure the association between the MRCCE activities in the Cx, AMY and HYP and the frequency of seizures of MTLE-HS patients who underwent epilepsy surgery for drug resistant epilepsy.

Material and methods

Were evaluated 24 consecutive patients with MTLE-HS who underwent epilepsy surgery between February 2009 and December 2011 at Centro de Epilepsia de Santa Catarina (CEPESC) and have their brain samples collected for this study. The medical history, seizure semiology, neurological examination, psychiatric and neuropsychological evaluation, interictal and ictal video-EEG analysis as well as the MRI findings were compatible with MTEL-HS.⁴⁻⁸ The inclusion criteria were: 1) seizure semiology consistent with MTLE, usually with epigastric, autonomic or psychic auras, followed by behavioral arrest, progressive clouding of consciousness, orolimentary and manual automatisms, and autonomic phenomena; 2) anterior and mesial temporal interictal spikes; 3) pre-surgical investigation compatible with unilateral seizure onset; 4) a clear cut unilateral Hippocampus sclerosis (HS) based on visual inspection of MRI findings.^{8,9} HS was defined as the combination of atrophy, an

increased T2-weighted signal, a decreased T1-weighted signal, and disrupted internal structure of the hippocampus, by visual inspection of the MRI images). No lesion other than atrophy and increased signal in hippocampal formation identified by MRI. The histopathology evaluation and HS sub-type classification based on the ILAE Commission on diagnostic methods were not done in the used samples.¹⁰

The exclusion criteria were: 1) focal neurological abnormalities on physical examination; 2) generalized or extra-temporal EEG spikes; 3) marked cognitive impairment on neuropsychological testing; 4) presence of other lesion than atrophy and increased signal in hippocampal formation identified by MRI.

The data were recorded using a research protocol approved by the Ethic Committee of our University and the Declaration of Helsinki.

An experienced neurophysiologist determined the monthly frequency of seizures impairing awareness of patients during the last four outpatient visits in the year preceding the surgery. Informed consent was obtained from all patients. The anesthetic protocol and antibiotic prophylaxis were the same for all patients. Thirteen patients received adjuvant anti-inflammatory therapy with dexamethasone (10 mg i.v. bolus). Antiepileptic drugs (AEDs) were maintained until the surgery. Surgical procedures and brain tissue sampling were done by the same neurosurgeon (M.N.L.) and the P.I. (R.W.) using a similar approach for all patients.

A maximum of 4 cm of the anterior lateral temporal lobe including the middle and inferior temporal gyros were resected. The mesial resection included the AMY and 1 to 3 cm of the anterior HIP (mostly 3.0 cm). All brain samples were frozen in liquid nitrogen immediately after collection and stored at - 80C for further analyzes. Before the temporal neocortical resection, a 0.5 to 1 cm² cortical sample of the Cx localized 3 cm posterior to the temporal pole was gently dissected from the white matter via a bistoury without previous thermo-coagulation. After assessing the mesial temporal region, two thirds of the AMY including its basal and lateral regions was collected using tweezers without thermo-coagulation. After AMY resection, the HIP was removed and its head quickly dissected on ice-refrigerated glass and then frozen in liquid nitrogen. We recorded the total time of HIP manipulation from coagulation of the vascular supply to complete resection.

The hemodynamic and respiratory data were recorded. These remained stable and with no trans-operative surgical complications. Arterial blood gases, electrolytes, hematocrit, hemoglobin, acid-basic and hemodynamic parameters (heart rate, respiratory rate and mean arterial pressure) were controlled. The MRCCE activities were measured spectrophotometrically with a Varian Cary 50 spectrophotometer with temperature control (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Complex I activity was measured via the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm.¹¹ The activities of succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP)-oxidoreductase (complex II) and succinate phenazine oxidoreductase (succinate dehydrogenase – SDH; complex II) were determined according to Fischer et al., 1985.¹² The cytochrome c oxidase (complex IV) was assayed according to Rustin et al., 1994.¹³ The methods were slightly modified from our previous report.¹⁴

The enzymatic activities were calculated as $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein. All the biochemical analyses were blinded for the clinical and neurosurgical variables. Linear regressions were used to determine the association between MRCCE levels in the Cx, HIP and AMY and seizure frequency (strong enough to impair awareness). The study has a statistical power ($1-\beta$) of 70% to find an association between one enzyme activity and the seizures frequency with an $r^2 \geq 0.30$.

Results: The clinical and demographic variables are presented in Table 1. The association between seizures frequency and MRCCE levels in the Cx, HIP and AMY of patients with drug-resistant MTLE-HS are presented in Table 2. There was a significant positive association between the succinate-desidrogenase activity in the Cx and seizure frequency. In the AMY, there was a trend ($p = 0.09$) toward positive association between complex II and seizure frequency. The results are not significant ($p > 0.30$) after correction for variations in the clinical and trans-operative parameters (data not shown). The probability of a lack of association is even higher if a lower "p" level is applied considering the multiple comparisons that were performed. The results suggest that interictal mitochondrial respiration in the studied structures were not significantly affected by the variations of the monthly seizure frequencies in this patient cohort (mean of 8 with minimum of 1 and a maximum of 30).

Discussion

In the present work we demonstrated that the frequency of seizures in drug resistant MTLE-HS was not independently associated with MRCCE activities in Cx, AMY and HIP. These findings cannot be generalized to all other epileptic syndromes or patients with MTLE-HS and a lower frequency of seizures. Because we analyzed the whole homogenate structures (amygdala, head of hippocampus and neocortex) we cannot exclude the possibility of association between the seizure frequency of patients and enzymatic changes in sub-regions of the analyzed brain areas (like hippocampus sub-fields, amygdala nucleus or neocortex layers). In fact, specific deficiency of complex I of the mitochondrial respiratory chain in the hippocampal CA3 region of the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy.³

Recent findings using FDG-PET demonstrated that dominant temporal lobe hypometabolism was associated with relatively inferior verbal memory, while nondominant temporal lobe hypometabolism was associated with inferior nonverbal memory. The association between the MRCCE activities of temporal lobe samples and the cognitive and psychiatric manifestations of MTLE-HS are important points to be investigated in the future.

Considering the statistical power of our study (70% to find an association between one enzyme activity and the seizures frequency with an $r^2 \geq 0.30$), a type II error can be considered if weaker associations were not detected in the present analysis. The study design does not permit conclusions about the role of MRCCE on the epileptogenesis processes but indicates the occurrence of adaptive mechanisms in the MRCCE activities to seizure frequency in drug-resistant MTLE-HS patients.

Further works are required to clarify the adaptive mechanisms of brain mitochondrial enzymes to seizures in patients with MTLE-HS. Studies using brain samples from extra-temporal epilepsies including those related to focal cortical dysplasia¹⁵ and correlation between MRCCE activities and histopathology findings are also important points to be investigated.

Conclusion:

The results suggest the interictal MRCCE activities in temporal lobe structures are not associated with frequency of seizures in drug resistant MTLE-HS. Our findings cannot be generalized to

all other epileptic syndromes. The independent association between other clinical variables including cognitive performance and psychiatric symptoms and the MRCCE activities in the temporal lobe structures deserve further investigation in MTLE-HS.

All authors declare that there was no potential conflict of interest.

Acknowledgments: This work was supported by Programa de Apoio a Núcleo de Excelência PRONEX - FAPESC/CNPq (NENASC Project), CNPq (Brazilian Council for Scientific and Technologic Development, Brazil), and FAPESC (Foundation for Scientific Research and Technology of the State of Santa Catarina).

References:

1. Babcock GT, Wikstrom M. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature*. 1992;356(6367):301-309.
2. Rowley S, Patel M. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Free radical biology & medicine*. 2013;62:121-131.
3. Kunz WS, Kudin AP, Vielhaber S, Blümcke I, Zuschratter W, Schramm J, Beck H, Elger CE. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 2000;48:766-773.
4. Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *New Engl J Med*. 2001;345(5):311-318.
5. Guarnieri R, Walz R, Hallak JE, et al. Do psychiatric comorbidities predict postoperative seizure outcome in temporal lobe epilepsy surgery? *Epilepsy Behav*. 2009;14(3):529-534.
6. Nunes JC, Zakon DB, Claudino LS, et al. Hippocampal sclerosis and ipsilateral headache among mesial temporal lobe epilepsy patients. *Seizure*. 2011;20(6):480-484.
7. Pauli C, Thais ME, Claudino LS, et al. Predictors of quality of life in patients with refractory mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2012;25(2):208-213.

8. Araújo D, Santos AC, Velasco TR, Wichert-Ana L, Terra-Bustamante VC, Alexandre V Jr, Carlotti CG Jr, Assirati JA Jr, Machado HR, Walz R, Leite JP, Sakamoto AC. Volumetric evidence of bilateral damage in unilateral mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2006;47(8):1354-9.
9. Cendes F, Sakamoto AC, Spreafico R, Bingaman W, Becker AJ. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2014;128(1):21-37).
10. Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, Bernasconi N, Bien CG, Cendes F, Coras R, Cross JH, Jacques TS, Kahane P, Mathern GW, Miyata H, Moshé SL, Oz B, Özkara Ç, Perucca E, Sisodiya S, Wiebe S, Spreafico R. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*. 2013;54(7):1315-29.
11. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996;328(2):309-316.
12. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Int J Clin Chem*. 1985;153(1):23-36.
13. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Int J Clin Chem*. 1994;228(1):35-51.
14. Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, et al. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genetics Metab*. 2005;86(1-2):188-199.
15. Alexandre V Jr, Walz R, Bianchin MM, Velasco TR, Terra-Bustamante VC, Wichert-Ana L, Araújo D Jr, Machado HR, Assirati JA Jr, Carlotti CG Jr, Santos AC, Serafini LN, Sakamoto AC. Seizure outcome after surgery for epilepsy due to focal cortical dysplastic lesions. *Seizure*. 2006;15(6):420-7.

Table 1: Clinical and demographic characteristics of patients.

Variables	All Cases (n = 24) n (%)
Gender	
Female	15 (62.5)
Male	9 (37.5)
Race	
Caucasian	20 (83.3)
African-Brazilians	4 (16.7)
Side of the HS ^a	
Right	12 (50.0)
Left	12 (50.0)
AEDs treatment regimen ^b	
Monotherapy	10 (41.7)
Polytherapy	14 (58.3)
	Mean (S.E.M)
Age, years	37.1 (2.0)
Disease duration, years	25.5 (2.0)
Age of epilepsy onset, years	11.6 (1.7)
Monthly frequency of seizures (min. 1 and max. 30)	8.4 (1.6)
Time-course between the last seizure and surgery (h) ^c	235.5 (101.3)
Time of brain samples storage (months) ^d	24 (2.0)

^a HS = Hippocampus sclerosis;

^b AEDs: antiepileptic drugs were: CBZ: carbamazepine (n = 19), PNB: phenobarbital (n = 7), DPH: diphenilhydantoin (n = 3); OXC/BZ: Oxcarbazepine (n = 3); LMT: Lamotrigine (n = 3); and TPM: Topiramate (n = 2). VA = Valproic acid (n = 2). Adjuvant benzodiazepines were used in 11 patients;

^c Time between the last seizure and surgery (hours);

^d Storage time under -86C (month)

Table 2: Univariate analysis showing the association between monthly seizure frequency and the mitochondrial respiration parameters in the hippocampus of patients with drug resistant MTLE-HS.

Brain areas	r	r²	B	p value
Temporal Neocortex				
Complex I	0.16	0.03	2.54	0.43
Complex II	0.03	0.001	- 0.001	0.90
Succinate-Desidrogenase	0.39	0.15	0.05	0.05 ^a
Complex IV	0.09	0.009	- 0.02	0.65
Hippocampus				
Complex I	0.22	0.05	- 1.8	0.25
Complex II	0.08	0.007	0.002	0.68
Succinato-Desidrogenase	0.001	0.01	0.000	0.94
Complex IV	0.02	0.000	- 0.002	0.93
Amygdala				
Complex I	0.002	0.000	0.19	0.94
Complex II	0.36	0.13	0.01	0.09 ^a
Succinato-Desidrogenase	0.24	0.06	0.02	0.28
Complex IV	0.17	0.03	0.01	0.44

^a These associations remain not significant ($p > 0.30$) after correcting for other clinical and trans-operative parameters.

ANEXO D – ARTIGO 2: JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS

MITOCHONDRIAL RESPIRATION CHAIN ENZYMATIC ACTIVITIES IN THE HUMAN BRAIN: METHODOLOGICAL IMPLICATIONS FOR TISSUE SAMPLING AND STORAGE

Marcelo Fernando Ronsoni,¹ Aline Pertile Remor,² Mark William Lopes,³ Alexandre Hohl,¹ Iris H. Z. Troncoso,¹ Rodrigo Bairy Leal,^{1,3} Gustavo Luchi Boos,⁴ Jean Costa Nunes,^{1,5} Marcelo Neves Linhares,^{1,6, 7} Kátia Lin,^{1,8} Alexandra Susana Latini,^{1,2} Roger Walz^{1,8}.

7. Centro de Neurociências Aplicadas, Hospital Universitário (HU), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil.

8. Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, UFSC; Florianópolis, SC, Brasil.

9. Laboratório de Transdução de Sinal no Sistema Nervoso Central, Departamento de Bioquímica, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

10. Centro de Ensino e Treinamento Integrado de Anestesiologia, Hospital Governador Celso Ramos (HGCR), Florianópolis, SC;

11. Laboratório de Neuropatologia, Serviço de Patologia, HU, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil;

12. Serviço de Cirurgia de Epilepsia, HGCR, Florianópolis, SC, Brasil;

13. Divisão de Neurocirurgia, Departamento de Cirurgia, HU, UFSC; Florianópolis, SC, Brasil;

14. Serviço de Neurologia, Departamento de Clínica Médica, HU, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil;

Manuscript Number:

Title: MITOCHONDRIAL RESPIRATION CHAIN ENZYMATIC ACTIVITIES IN FROZEN HUMAN BRAIN: METHODOLOGIC IMPLICATIONS FOR THE BRAIN TISSUE SAMPLING AND STORAGE DURING EPILEPSY SURGERY

Article Type: Research Article

Section/Category: Basic Neuroscience

Keywords: Mitochondria respiration; Amygdala; Hippocampus; Predictor model

Corresponding Author: Mr. Marcelo Ronsoni,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Catarina - Hospital Universitário

First Author: Marcelo Ronsoni

Order of Authors: Marcelo Ronsoni; Aline P Remor; Mark W Lopes; Iris H Troncoso; Rodrigo B Leal; Gustavo L Boos; Jean C Nunes; Marcelo N Linhares; Katia Lin; Alexandra S Latini; Roger Walz

Abstract: Background: The mitochondrial respiratory chain complexes enzymatic (MRCCE) activities can be successfully evaluated in brain samples frozen and adequately storage for further analysis. Epilepsy surgery offers an ethical opportunity to study the human brain tissue removed to treat drug resistant epilepsies. The elective neurosurgeries are done under well controlled conditions with hemodynamic and laboratorial parameters that are maintained almost in the physiologic range, there is none study analyzing the association these parameters and MRCCE in the human brain tissue. Method: Using multiple linear regressions we determine the intra-operative parameters independently associated to MRCCE activities in middle temporal neocortex (Cx), amygdale (AMY) and head of hippocampus (HIP) samples of patients (n = 23) who underwent temporal lobectomy. Results: The predictive models vary according to the brain area and MRCCE studied. The linear regressions showed a moderate to strong association ($r = 0.56$ to 0.88) among the MRCCE and the mean arterial pressure, O₂ saturation, hemoglobin, blood PO₂, anesthesia duration until the tissue sampling. The time-course since the last seizure attack until the tissue sampling and the time of its storage until the biochemical assessments also predict dome MRCCE activities. Conclusion: Intraoperative hemodynamic and laboratorial parameters, as well the time-course since the last seizure attack until the tissue sampling and the time of its storage until the biochemical analysis influences the MRCCE activities in human frozen samples Cx, AMYG and HIP. These variables need to be careful controlled to avoid confounding bias in studies of human brain samples collected from elective neurosurgery.

ABSTRACT

Background: Mitochondrial respiratory chain complexes enzymatic (MRCCE) activities were successfully evaluated in frozen brain samples. Epilepsy surgeries are done with hemodynamic and laboratory parameters to maintain physiology, but there are no studies analyzing the association among these parameters and MRCCE activities in the human brain tissue.

Method: We determined the intra-operative parameters independently associated with MRCCE activities in middle temporal neocortex (Cx), amygdala (AMY) and head of hippocampus (HIP) samples of patients ($n = 23$) who underwent temporal lobectomy using multiple linear regressions.

Results: MRCCE activities in Cx, AMY and HIP are differentially associated to trans-operative mean arterial blood pressure, O₂ saturation, hemoglobin, and anesthesia duration to time of tissue sampling. The time-course between the last seizure occurrence and tissue sampling as well as the sample storage to biochemical assessments were also associated with enzyme activities. Linear regression models including these variables explain 13 to 17% of MRCCE activities and show a moderate to strong effect ($r = 0.37$ to 0.82).

Conclusion: Intraoperative hemodynamic and laboratory parameters as well as the time from last seizure to tissue sampling and storage time are associated with MRCCE activities in human samples from the Cx, AMYG and HIP. Careful control of these parameters is required to minimize confounding biases in studies using human brain samples collected from elective neurosurgery.

Key words: Mitochondria respiration; Amygdala; Hippocampus; Predictor model

1. INTRODUCTION

The brain has a very high metabolic rate and the neuronal functions are particularly sensitive to any mitochondrial dysfunction [1] and mitochondrial medicine has emerged as a new discipline resting at the intersection of mitochondrial biology, pathology, and pharmaceuticals [2]. The respiratory chain (RC) consists of five enzyme complexes that are distributed in a special way in the inner mitochondrial membrane. The electrons coming from the Krebs cycle and other reactions catalyzed by

dehydrogenases are transferred to the RC with molecular oxygen as the final acceptor [3]. Mitochondria are critical modulators of cell function and are increasingly recognized as proximal sensors and effectors that ultimately determine the balance between cell survival and cell death [4].

Brain banks are promising facilities to understanding of neurological/neurodegenerative disorders, but many factors are known to interfere with tissue and molecular preservation of samples [5] including: *i*) pre-mortem agonal state, hypoxia, acidosis, fever and seizures; *ii*) post-mortem delay between death and sample processing for storage and fixation including temperature of the corpse and characteristics of the fixative solutions and processing of frozen material; and *iii*) unpredictable factors that would lead to variations from case to case or from region to region from the same brain despite similar *premortem* and *postmortem* conditions.

The mitochondrial respiratory chain complexes enzymatic (MRCCE) activities can be successfully evaluated in biological samples that are quickly frozen after sampling and stored at -80C. The mesial temporal lobe epilepsy related to the hippocampal sclerosis (MTLE-HS) is the most common surgically remediable epileptic syndrome [6,7,8,9]. The surgery involves a standard technique of "en bloc" resection of the temporal pole—part of the amygdala— and offers an ethical opportunity to obtain human brain tissue for human brain mitochondrial studies.

The MRCCE in brain samples can potentially be affected by the several clinical variables. In addition, potential biases in the MRCCE activity analysis may result from the sample collection procedure and storage. Here we investigated if the intra-operative hemodynamic and laboratorial parameters variations are independently associated with MRCCE activities in brain samples of middle temporal neocortex (Cx), amygdala (AMY) and head of hippocampus (HIP) of patients with drug-resistant MTLE-HS who underwent epilepsy surgery. We also analyzed the time from last seizure to tissue sampling as well as sample storage duration to enzymatic evaluation. The results will be helpful for the adequate planning of metabolic and biochemistry studies using brain samples collected during neurosurgery.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Patients

We analyzed 24 consecutive adult patients with drug-resistant MTLE-HS who were treated surgically between February 2009 and December 2011 at Centro de Epilepsia de Santa Catarina (CEPESC). All patients had complete a medical history, seizure semiology, neurological examination, psychiatric and neuropsychological evaluation, interictal and ictal video-EEG analysis, and MRI findings consistent with MTLE-HS [10,11,12,13,14,15]. The clinical variables were gender, race, side of the hippocampus sclerosis (HS), age, disease duration (in years), and age of epilepsy onset (recurrent seizures). Patients were considered to be under monotherapy if they were using only one antiepileptic drug (AED). Patients using two or more AEDs (associated or not with benzodiazepines [BDZs]) were classified as being under polytherapy.

This article has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The local Research Ethics Committee approved the study and informed consent was collected from all patients.

2.2. Anesthesia protocol

The anesthetic protocol was the same for all patients. Anesthesia was done with i.v. bolus of propofol (2 mg/kg), fentanyl (2 µg/kg) and rocuronium (0.9 mg/kg) followed by remifentanyl on an infusion pump (0.1 to 0.2 µg/kg 7 min i.v.) and isoflurane inhalation (0.5 to 0.6 M.A.C.). Hydration was done with isotonic saline infusion at a 1.2 ml/kg/hour rate plus half the volume of diuresis. Antibiotic prophylaxis with cephalotine (30 mg/kg) 30 minutes before the anesthesia started and repeated 4 hours later. The last 13 patients received a dexamethasone (10 mg i.v. bolus) as an adjunctive anti-inflammatory therapy. All the AEDs were maintained until the surgery (p.o. dose at 6 a.m.). Patients who were not under DPH treatment at home received 10 mg/kg of DPH i.v. 8 to 10 hours before the anesthesia induction and a supplementary dose of 5 mg/kg i.v. after HIP removal. Patients treated with DPH at home received their morning oral dose and a trans-operative supplemental dose.

2.3. Surgery and brain tissue sampling and trans-operative variables

The neurosurgeon resected a maximum of 4 cm of the anterior lateral temporal lobe including the middle and inferior temporal gyros. The mesial resection included the AMY and 1 to 3 cm of the anterior HIP (mostly 3.0 cm). The collected brain tissue came from the area that was removed in the normal course of epilepsy surgery. All brain samples were frozen in liquid nitrogen immediately after collection and then transferred to a -80C freezer for further analyzes. Before the temporal neocortical resection, a 0.5 to 1 cm² cortical sample of the Cx localized 3 cm posterior to the temporal pole was gently dissected from the white matter via a bistoury without previous thermo-coagulation. After assessing the mesial temporal region, two thirds of the AMY including its basal and lateral regions were collected using tweezers and without thermo-coagulation. After AMY resection, the "en block" HIP was removed and the HIP was quickly dissected on ice-refrigerated glass and then frozen in liquid nitrogen. The total time of HIP manipulation from bipolar electro-coagulation of HIP vascular supply to its complete resection was recorded in each case. The hemodynamic and respiratory parameters remained stable during all the procedures; no trans-operative complications were reported. Arterial blood gases, electrolytes, hematocrit, hemoglobin, acid-basic and hemodynamic parameters (heart rate, respiratory rate and mean arterial pressure) were analyzed when the AMY was resected. The time-course from the initiation of anesthesia to sample resection was recorded. The surgical approach was similar for all patients. All surgical procedures and brain tissue sampling were done by the same neurosurgeon (M.N.L.) and the P.I. (R.W.).

2.4. Tissue preparation homogenization

Samples were weighed and mechanically homogenized with a ground glass Potter-Elvehjem homogenizer in four volumes (v/v) of 50 mM Tris, pH 7.0, 1.0 mM EDTA, 100 mM NaF, 0.1 mM PMSF, 2.0 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% glycerol, and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Homogenates were placed on ice for 10 min and centrifuged at 3,000 x g at 4°C for 10 min. Aliquots of the supernatants were used to measure the MRCE activities after thawing the samples

three times. Sample preparation was carried out in an Eppendorf 5415 R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany).

2.5. Mitochondrial Respiratory Chain Complex Enzymatic Activities

MRCE activities were measured spectrophotometrically with a Varian Cary 50 spectrophotometer with temperature control (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Complex I activity was measured by the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm [16]. The activities of succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP)-oxidoreductase (complex II) and succinate phenazine oxidoreductase (succinate dehydrogenase – SDH; complex II) were determined according to Fischer et al., 1985 [17]. The cytochrome c oxidase (complex IV) was assayed according to Rustin et al., 1994 [18]. The methods described here to measure activities were slightly modified from a previous report [19]. The activities were calculated as $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein.

3. Statistical analysis

Univariate analyses using linear regression were done to identify the trans-operative variables associated with the enzymatic activity of each MRCE in the Cx, AMY, and HIP. Multiple linear logistic regression analysis was done to identify the independent predictors of MCRE activities in different brain regions. For this analysis, variables were identified by the previous univariate analysis with a "p" value lower than 0.15. For the final model, we retained those variables that had a significant ($p \leq 0.05$) association with the dependent variable. In terms of sample size, our linear regression model had 10 variables and an expected r^2 of 0.30—the calculated statistical power ($1 - \beta$) was 0.82. To avoid the possibility of type II errors no adjustments of "p" level due multiple tests were done [20].

3. RESULTS

The variables of the MTLE-HS patients are presented in the Table I and II. Table III shows the associations among the hemodynamic and laboratorial parameters and the MRCCE of samples collected from different brain areas showing a "p" level bellow 0.15.

The variables independently associated with MCCRE activity in samples from Cx, AMY, and HIP (Table IV). In the final

regression models, the O₂ saturation percentage, time of brain samples storage and glucose were negative predictors of the MRCCE activities. The mean arterial pressure, hemoglobin, and duration of anesthesia to brain tissue sampling were positive predictors. The combination of predictive variables differs according to the studied enzymes. Interestingly, the time from last seizure to brain sampling showed a trend ($p = 0.08$) toward negative association with Complex I activity in HIP but a significant positive association in AMY.

The linear regression model including the MAP and O₂ saturation showed a good and significant association with the enzymatic activity of Complex I and explains 38% of its variation in the Cx. In the same structure, only the storage time remained associated with the activity of Complex II and explains 71% of its variation. The model including hemoglobin levels, anesthesia time until Cx sampling, and glucose levels showed a good and significant association with the succinate-desidrogenase activity and explains 52% of its enzymatic activity variation. In the Cx, only the time of brain sample storage remained associated with Complex IV activity among all the analyzed variables.

In the AMY only the time from last seizure was associated with the enzymatic activity of Complex I. In the same structure, the time of brain sample storage showed a good and significant association with Complex II, and explains 41% of its variation. Only storage time was associated with the succinate-desidrogenase activity in AMY; it explained 39% of its enzymatic activity variation in this structure. In the AMY, 53% of variation in this Complex IV was associated with the time of anesthesia.

Among the HIP samples, the time from last seizure shows a non-significant trend for negative association with the enzymatic activity of Complex I. In the same structure, the storage time and O₂ saturation percentage had a strong and significant association with Complex II activity and explained 64% of its variation. The storage time showed a moderate and significant association with the succinate-desidrogenase activity and explained 31% of its enzymatic activity variation in the HIP. In this structure, the enzymatic activity of Complex IV showed a model with hemoglobin. This model had a non-significant trend ($p = 0.10$) for a moderate association with Complex IV enzymatic activity. This trend explained 34% of the variation.

4. DISCUSSION:

We evaluated the association among anesthesia time to brain tissue sampling, trans-operative electrolytes, blood gases, hemodynamics, pH, respiratory parameters and MCEE activities in the Cx, AMY and HIP of patients with drug-resistant MTLE-HS who underwent epilepsy surgery. The percentage of O₂ saturation, the storage time and glucose levels were negative predictors for MRCCE activity. The ATP production in mitochondria is driven by the mitochondrial oxidative phosphorylation OXPHOS machinery that is composed of five multi-subunit complexes (complex I–V). Complexes I and II are fed with electrons carried by the coenzymes NADH and FADH₂ that are mainly formed at the Krebs Cycle level, respectively. These are then transferred to complex III by the lipid electron transporter coenzyme Q, and then to cytochrome c to complex IV and finally to O₂. The redox energy released during the electron transfer process in complexes I, III, and IV is used to actively pump H⁺ from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. This generates an electrochemical gradient of H⁺ across the inner membrane that is ultimately utilized by complex V to produce ATP [21].

Partial reduction of O₂ also occurs during this aerobic respiration (up to 2-5%) as a physiological process and forms reactive oxygen species (ROS). Complexes I and III have been reported to be major sites of ROS generation in mitochondria under physiological conditions [22,23], and higher ROS production is expected when these redox centers are compromised [24,25]. On the other hand, lower levels of ROS formation would be expected with lower O₂ tissue availability (low levels of PO₂ and O₂ saturation). Mitochondria *in vivo* are thought to be exposed to about 5% of the total tissue O₂ tension, and indeed the O₂ gradient between the extracellular environment and mitochondria where O₂ is consumed by complex IV results in a significantly lower O₂ exposure for mitochondria.

Below this physiological threshold for O₂ availability, most cells might be exposed to hypoxic conditions [26] that would immediately trigger activation of other (AMP-activated protein kinase) AMPK-dependent energy pathways to maintain ATP cell levels (*i.e.* activation of glycolysis). This would change the phenotype of brain bioenergetics. Under longer O₂ exposures, cells will activate additional mechanisms involving the stimulation

of hypoxia-inducible factors (HIFs) [27] to adapt cells to lower O₂ tensions and reduce mitochondrial oxidative metabolism and thus MRCCE activity.

Therefore, patient PO₂ and O₂ saturation is a very sensitive parameter (here shown as a negative association) that should be considered when human *ex vivo* brain bioenergetics are assessed.

Storage time also negatively correlated with MRCCE activities. This association has been previously demonstrated in brain human autopsy samples [28]. Here, a 75% reduction in mitochondrial activity was observed in a ten-hour *postmortem* freezing time. Although the authors did not indicate how long the samples were stored, they found that a three-hour *postmortem* freezing time led to a 40% decrease in mitochondrial activity versus fresh rat brain samples.

In our study, data showed that complex I activities were similar in snap frozen cortical samples from rat adult brain (complex I activity was 720 ± 110 nmol/min/mg protein) that remained at -86°C for 7 days (data not shown) suggesting immediate freezing is essential to avoid confounding results. However, we did not follow this activity for different freezing time intervals. This variable could lead to degradation of many mitochondrial proteins as described previously [5]. Therefore, this might suggest the need for an exquisite and time-sensitive sample collection in studies involving neurochemical analysis that can be directly or indirectly affected by mitochondrial activity in brain tissue.

The mean arterial pressure, hemoglobin and duration of anesthesia to tissue sampling were positive predictors of enzymatic activities. The reduction in MAP and hemoglobin are directly involved with tissue blood supply and, as a consequence, a lower supply of nutrients and oxygen are required for mitochondrial energy production. In our patients, these parameters were maintained close to the physiologically normal range, but the results suggest that slight changes outside the normal range are negatively associated with MRCCE activity.

The anesthesia time to sampling also showed a positive correlation with MRCCE activities in Cx (complex I, II and succinate-desidrogenase), AMY (complex IV), and HIP (Complex II). This suggests a time-dependent hypermetabolic effect of the anesthesia in our patients. Interesting, *in vitro* mitochondrial

synaptosomal preparation showed that isoflurane (1 and 2 MAC) might act as a metabolic inhibitor by depolarizing pre-synaptic mitochondria through inhibition of the electron transport chain [29]. However, in our patients the mean time of isoflurane anesthesia (0.5 to 0.6 C.A.M.) was 188 min for the Cx samples and 255 minutes for AMY/HIP. The different exposure time to isoflurane doses may explain the contradictory results of our study and those reported *in vitro* by Bains and coworkers.

The time from last seizure to brain sampling showed a negative association with Complex I activity in HIP versus a positive association with AMY. This dissociation between AMY and HIP suggests the interictal time duration may have an opposite metabolic effect on these limbic structures. Although the seizures can start or propagate to AMY, the HIP is considered the primary epileptogenic zone in drug resistant MTLE-HS [30] and neuronal loss and gliosis are particularly more intense in the HIP [12,31]. Taken together, these histological and functional differences between AMY and HIP may explain the opposite association among Complex I enzymes in these structures with the time from last seizure to sampling.

The relationship between Complex I enzymatic activity variation due to interictal time duration and psychiatric comorbidities [11,32] including the mood symptom changes observed in forced normalization phenomena is an important point to be investigated [33,34], particularly because of the role of AMY and HIP on mood disorders [35]. Furthermore, on experimental [36,37] and clinical findings [37], the association between the MRCCE activities in AMY and HIP and the cognitive performance, with especial focus on declarative memory function, also deserves further evaluation.

To summarize, MRCCE activities in human brain samples collected during neurosurgeries can be significantly ($p < 0.05$) affected by storage. They are also affected by trans-operative hemodynamic and laboratory parameters during sampling. These parameters may be differentially associated with MRCCE as a function of brain structure. Understanding and controlling these potential confounding biases during brain studies is critical to performing reproducible and high impact research. Indeed, adopting uniform sampling schemes will facilitate translational research in applied neurochemistry.

Acknowledgements: This work was supported by FAPESC/CNPq, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência PRONEX (NENASC Project), Santa Catarina, Brazil.

REFERENCES

- [1] C. Batandier, L. Poulet, I. Hininger, K. Couturier, E. Fontaine, A.M. Roussel, F. Canini, Acute stress delays brain mitochondrial permeability transition pore opening, *J Neurochem* 131 (2014) 314-322.
- [2] L. Milane, M. Trivedi, A. Singh, M. Talekar, M. Amiji, Mitochondrial biology, targets, and drug delivery, *J Control Release* 207 (2015) 40-58.
- [3] G.T. Babcock, M. Wikstrom, Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration, *Nature* 356 (1992) 301-309.
- [4] B. Agarwal, D.F. Stowe, R.K. Dash, Z.J. Bosnjak, A.K. Camara, Mitochondrial targets for volatile anesthetics against cardiac ischemia-reperfusion injury, *Front Physiol* 5 (2014) 341.
- [5] I. Ferrer, A. Martinez, S. Boluda, P. Parchi, M. Barrachina, Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies, *Cell Tissue Bank* 9 (2008) 181-194.
- [6] N. Usui, K. Baba, K. Matsuda, T. Tottori, K. Terada, K. Usui, K. Araki, Y. Araki, H. Hosoyama, Y. Inoue, T. Mihara, Mesial temporal lobe epilepsy with no specific histological abnormality: a distinct surgically remediable syndrome, *Epilepsy Behav* 29 (2013) 542-547.
- [7] A. Abosch, N. Bernasconi, W. Boling, M. Jones-Gotman, N. Poulin, F. Dubeau, F. Andermann, A. Olivier, Factors predictive of suboptimal seizure control following selective amygdalohippocampectomy, *J Neurosurg* 97 (2002) 1142-1151.
- [8] O. Sagher, J.P. Thawani, A.B. Etame, D.M. Gomez-Hassan, Seizure outcomes and mesial resection volumes following selective amygdalohippocampectomy and temporal lobectomy, *Neurosurg Focus* 32 (2012) E8.
- [9] K.A. Bujarski, F. Hirashima, D.W. Roberts, B.C. Jobst, K.L. Gilbert, R.M. Roth, L.A. Flashman, B.C. McDonald, A.J. Saykin, R.C. Scott, E. Dinnerstein, J. Preston, P.D. Williamson, V.M. Thadani, Long-term seizure, cognitive,

- and psychiatric outcome following trans-middle temporal gyrus amygdalohippocampectomy and standard temporal lobectomy, *J Neurosurg* 119 (2013) 16-23.
- [10] V. Alexandre, Jr., R. Walz, M.M. Bianchin, T.R. Velasco, V.C. Terra-Bustamante, L. Wichert-Ana, D. Araujo, Jr., H.R. Machado, J.A. Assirati, Jr., C.G. Carlotti, Jr., A.C. Santos, L.N. Serafini, A.C. Sakamoto, Seizure outcome after surgery for epilepsy due to focal cortical dysplastic lesions, *Seizure* 15 (2006) 420-427.
- [11] R. Guarnieri, R. Walz, J.E. Hallak, E. Coimbra, E. de Almeida, M.P. Cescato, T.R. Velasco, V. Alexandre, Jr., V.C. Terra, C.G. Carlotti, Jr., J.A. Assirati, Jr., A.C. Sakamoto, Do psychiatric comorbidities predict postoperative seizure outcome in temporal lobe epilepsy surgery?, *Epilepsy Behav* 14 (2009) 529-534.
- [12] D. Araujo, A.C. Santos, T.R. Velasco, L. Wichert-Ana, V.C. Terra-Bustamante, V. Alexandre, Jr., C.G. Carlotti, Jr., J.A. Assirati, Jr., H.R. Machado, R. Walz, J.P. Leite, A.C. Sakamoto, Volumetric evidence of bilateral damage in unilateral mesial temporal lobe epilepsy, *Epilepsia* 47 (2006) 1354-1359.
- [13] J.C. Nunes, D.B. Zakon, L.S. Claudino, R. Guarnieri, A. Bastos, L.P. Queiroz, R. Walz, K. Lin, Hippocampal sclerosis and ipsilateral headache among mesial temporal lobe epilepsy patients, *Seizure* 20 (2011) 480-484.
- [14] C. Pauli, M.E. Thais, L.S. Claudino, M.A. Bicalho, A.C. Bastos, R. Guarnieri, J.C. Nunes, K. Lin, M.N. Linhares, R. Walz, Predictors of quality of life in patients with refractory mesial temporal lobe epilepsy, *Epilepsy Behav* 25 (2012) 208-213.
- [15] R. Guarnieri, L. Wichert-Ana, J.E. Hallak, T.R. Velasco, R. Walz, M. Kato, V. Alexandre, Jr., V.C. Terra-Bustamante, M.M. Bianchin, A.W. Zuardi, J.F. Deakin, A.C. Sakamoto, Interictal SPECT in patients with mesial temporal lobe epilepsy and psychosis: a case-control study, *Psychiatry Res* 138 (2005) 75-84.
- [16] A. Cassina, R. Radi, Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport, *Arch Biochem Biophys* 328 (1996) 309-316.
- [17] J.C. Fischer, W. Ruitenbeek, J.A. Berden, J.M. Trijbels, J.H. Veerkamp, A.M. Stadhouders, R.C. Sengers, A.J.

- Janssen, Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle, *Clin Chim Acta* 153 (1985) 23-36.
- [18] P. Rustin, D. Chretien, T. Bourgeron, B. Gerard, A. Rotig, J.M. Saudubray, A. Munnich, Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies, *Clin Chim Acta* 228 (1994) 35-51.
- [19] A. Latini, C.G. da Silva, G.C. Ferreira, P.F. Schuck, K. Scussiato, J.J. Sarkis, C.S. Dutra Filho, A.T. Wyse, C.M. Wannmacher, M. Wajner, Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues, *Mol Genet Metab* 86 (2005) 188-199.
- [20] T.V. Perneger, What's wrong with Bonferroni adjustments, *BMJ* 316 (1998) 1236-1238.
- [21] D.G. Nicholls, S.J. Ferguson, *Bioenergetics* 3, Academic Press, London, 2002.
- [22] A. Boveris, E. Cadenas, A.O. Stoppani, Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide, *Biochem J* 156 (1976) 435-444.
- [23] Q. Chen, E.J. Vazquez, S. Moghaddas, C.L. Hoppel, E.J. Lesnefsky, Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III, *J Biol Chem* 278 (2003) 36027-36031.
- [24] J.F. Turrens, Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain, *Biosci Rep* 17 (1997) 3-8.
- [25] J.F. Turrens, A. Boveris, Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria, *Biochem J* 191 (1980) 421-427.
- [26] B. Viollet, Y. Ailhaud, R. Mounier, B. Guigas, E. Zarrinpashneh, S. Horman, L. Lantier, S. Hebrard, J. Devin-Leclerc, C. Beauloye, M. Foretz, F. Andreelli, R. Ventura-Clapier, L. Bertrand, AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals, *Front Biosci (Landmark Ed)* 14 (2009) 19-44.
- [27] G.L. Semenza, G.L. Wang, A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Mol Cell Biol* 12 (1992) 5447-5454.

- [28] A. Navarro, A. Boveris, M.J. Bandez, M.J. Sanchez-Pino, C. Gomez, G. Muntane, I. Ferrer, Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies, *Free Radic Biol Med* 46 (2009) 1574-1580.
- [29] R. Bains, M.C. Moe, G.A. Larsen, J. Berg-Johnsen, M.L. Vinje, Volatile anaesthetics depolarize neural mitochondria by inhibition of the electron transport chain, *Acta Anaesthesiol Scand* 50 (2006) 572-579.
- [30] T.R. Velasco, A.C. Sakamoto, V. Alexandre, Jr., R. Walz, C.L. Dalmagro, M.M. Bianchin, D. Araujo, A.C. Santos, J.P. Leite, J.A. Assirati, C. Carlotti, Jr., Foramen ovale electrodes can identify a focal seizure onset when surface EEG fails in mesial temporal lobe epilepsy, *Epilepsia* 47 (2006) 1300-1307.
- [31] M. Thom, G.W. Mathern, J.H. Cross, E.H. Bertram, Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome?, *Ann Neurol* 68 (2010) 424-434.
- [32] R. Guarnieri, J.E. Hallak, R. Walz, T.R. Velasco, V. Alexandre Junior, V.C. Terra-Bustamante, L. Wichert-Ana, A.C. Sakamoto, [Pharmacological treatment of psychosis in epilepsy], *Rev Bras Psiquiatr* 26 (2004) 57-61.
- [33] M. Mula, F. Monaco, Antiepileptic drugs and psychopathology of epilepsy: an update, *Epileptic Disord* 11 (2009) 1-9.
- [34] J.A. Bragatti, C.M. Torres, P.A. Cherubini, S. Leistner-Segal, M.M. Bianchin, Is interictal EEG activity a biomarker for mood disorders in temporal lobe epilepsy?, *Clin Neurophysiol* 125 (2014) 1952-1958.
- [35] K. Wingenfeld, O.T. Wolf, Stress, memory, and the hippocampus, *Front Neurol Neurosci* 34 (2014) 109-120.
- [36] D. Jerusalinsky, J.A. Quillfeldt, R. Walz, R.C. Da Silva, M. Bueno e Silva, M. Bianchin, P. Schmitz, M.S. Zanatta, A.C. Ruschel, N. Paczko, et al., Effect of the infusion of the GABA-A receptor agonist, muscimol, on the role of the entorhinal cortex, amygdala, and hippocampus in memory processes, *Behav Neural Biol* 61 (1994) 132-138.
- [37] H.J. Markowitsch, A. Staniloiu, Amnesic disorders, *Lancet* 380 (2012) 1429-1440.

Table I: Clinical, demographic, and neuroradiological variables of MTL-ES patients and sample storage time.

Variables	All Cases (n = 24) n (%)
Gender	
Female	15 (62.5)
Male	9 (37.5)
Race	
Caucasian	20 (83.3)
African-Brazilians	4 (16.7)
Side of the HS ^a	
Right	12 (50.0)
Left	12 (50.0)
AEDs treatment regimen ^b	
Monotherapy	10 (41.7)
Polytherapy	14 (58.3)
Psychiatric diagnosis	
No diagnosis	10 (41.7)
Depression	8 (33.3)
Anxiety disorders	2 (8.3)
Other psychiatric conditions ^c	4 (12.5)
	Mean (S.E.M)
Age, years	37.1 (2.0)
Disease duration, years	25.5 (2.0)
Age of epilepsy onset, years	11.6 (1.7)
Monthly frequency of seizures	8.4 (1.6)
Time-course between the last seizure and surgery (h) ^d	235.5 (101.3)
Time of brain samples storage (months) ^e	24 (2.0)

^a HS = Hippocampus sclerosis;

^b AEDs: antiepileptic drugs were: CBZ: carbamazepine (n = 19), PNB: phenobarbital (n = 7); DPH: diphenilhydantoin (n = 3); OXCZ: Oxcarbazepine (n = 3); LMT: Lamotrigine (n = 3); and TPM: Topiramate (n = 2). VA = Valproic acid (n = 2). Adjuvant benzodiazepines were used in 11 patients;

^c Other psychiatric disorders related to epilepsy were: interictal psychosis (n = 2), post-ictal anxiety (n = 1), and interictal dysphoric disorder (n = 1);

^d Time between the last seizure and surgery (hours);

^e Storage time in -86C freezer (month)

Table II: Intraoperative, hemodynamic, laboratorial parameters and mitochondrial respiration chain enzyme activities.

VARIABLES	Range		Mean (S.E.M)
	Minimum	Maximum	
Hemodynamic parameters and anesthesia time			
MAP mmHg ^a	57	90	68 (1.9)
Heart rate per minute	50	96	71.1 (2.5)
Respiratory frequency	10	15	11.9 (0.3)
Time of anesthesia (min)			
Neocortex	119	255	188.4 (8.0)
	160	370	255 (10.8)
Amygdala/hippocampus			
Time of hippocampus manipulation (min)	5	44	13.0 (1.9)
Blood gases and acid-basic parameters (normal range)			
pH (7.35 to 7.45)	7.35	7.49	7.43 (0.0)
PCO ₂ (35 to 45 mmHg)	19.3	37.9	28.4 (0.8)
pO ₂ (80 to 100 mmHg)	99.5	319.8	227.4 (13.9)
Bicarbonate (22 to 46 mEq/L)	17.3	23.3	20.3 (0.3)
Total CO ₂ (24 to 31 mMol/L)	18.2	30.7	21.6 (0.5)
Base Excess (-3 to +3) mEq/L	- 6.40	- 0.50	- 2.6 (0.4)
O ₂ saturation (92 to 98%)	99.1	99.9	99.6 (0.1)
Hematologic parameters (normal range)			
Hematocrit (%), all cases	31	43	34.4 (0.8)
Male (40.0 – 53.0)	31	43	36.6 (1.5)
Female (37.0 – 47.0)	31	37	33 (0.5)
Hemoglobin (g/dL), all cases	10.2	14.2	11.4 (0.3)
Male (13.0 – 18.0)	10.3	14.2	12.1 (0.5)
Female (12.0 – 16.0)	10.2	12.2	10.9 (0.2)
Blood biochemical parameters (normal range)			
Glucose (< 100 mg/dL)	86	193	112.7 (5.9)
Sodium (136 – 145 mEq/L)	129	143	137.7 (0.7)

Potassium (3.3 – 5.1 mEq/L)	3.6	5.0	4.1 (0.1)
Ionic calcium (4.5 – 5.3 mg/dL)	3.5	4.7	4.1 (0.2)
Magnesium (0.45 – 0.6 mMol/L)	0.38	0.53	0.46 (0.0)
Lactic acid (0.4 – 2.2 mMol/L)	0.50	3.40	1.8 (0.2)

Enzymatic activities ($\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$)

Middle temporal neocortex

Complex I	576.7	1001.2	764.2 (23.6)
Complex II	0.83	2.1	1.53 (0.08)
Succinate-desidrogenase	1.0	4.0	2.03 (0.17)
Complex IV	2.6	8.0	4.42 (0.29)

Amygdala

Complex I	578.4	1014.7	754.84 (25.01)
Complex II	0.64	1.7	1.29 (0.07)
Succinate-desidrogenase	0.49	4.2	2.67 (0.24)
Complex IV	2.2	4.6	3.22 (0.14)

Head of hippocampus

Complex I	512.6	820.7	696.76 (15.01)
Complex II	0.5	1.6	1.05 (0.50)
Succinate-desidrogenase	0.7	3.6	2.41 (0.16)
Complex IV	2.2	5.7	3.21 (0.15)

Table III: Univariate analysis showing the hemodynamic and laboratorial parameters associated with the mitochondrial respiration of samples collected from different brain areas of drug-resistant MTLE-HS patients.

Brain areas, hemodynamic, and laboratory parameters	r	r²	B	p value
Neocortex				
Complex I				
MAP, in mmHg ^a	0.40	0.16	4.60	0.06
Anesthesia time until neocortex sampling (min) ^b	0.43	0.19	1.33	0.04
O ₂ saturation %	0.46	0.21	- 203.58	0.02
Time of samples freezing (months) ^c	0.42	0.17	- 5.01	0.04
Complex II				
Anesthesia time until neocortex sampling (min) ^b	0.49	0.24	0.005	0.02
pH	0.57	0.32	- 5.52	0.004
Base excess, mEq/L	0.44	0.19	-0.9	0.03
O ₂ saturation %	0.61	0.38	- 0.91	0.001
Succinato-Desidrogenase				
MAP, in mmHg ^a	0.36	0.13	0.03	0.09
Anesthesia time until neocortex sampling (min) ^b	0.34	0.12	0.01	0.11
Bicarbonate, mEq/L	0.36	0.13	0.18	0.08
Total CO ₂ , mMol/L	0.45	0.20	0.14	0.03
Hematocrit, %	0.40	0.16	0.10	0.06
Hemoglobin, g/dL	0.40	0.16	0.29	0.06
Glucose, mg/dL	0.40	0.16	- 0.01	0.10
Complex IV				
pH	0.34	0.11	- 11.99	0.11
Base excess, mEq/L	0.33	0.11	- 0.25	0.11
O ₂ saturation %	0.32	0.10	- 1.74	0.12
Ionic calcium, mg/dL	0.35	0.12	- 0.59	0.14
Lactic acid, mMol/	0.39	0.15	- 0.59	0.09
Time of samples freezing (months) ^c	0.39	0.15	- 0.06	0.05

Amygdala				
Complex I				
MAP, in mmHg ^a	0.36	0.13	4.20	0.12
Time since the last seizure (hours) ^d	0.48	0.23	0.11	0.04
Complex II				
pH	0.47	0.22	- 3.43	0.04
O ₂ saturation	0.39	0.15	- 0.45	0.09
Time of samples freezing (months) ^c	0.62	0.39	- 0.02	0.003
Succinato-Desidrogenase				
Time of samples freezing (months) ^c	0.62	0.39	- 0.08	0.003
Complex IV				
Anesthesia time until amygdala sampling (min) ^f	0.53	0.28	0.007	0.02
Hippocampus				
Complex I				
Time since the last seizure (hours) ^d	0.37	0.14	- 0.06	0.09
Complex II				
Anesthesia time until hippocampus sampling (min) ^g	0.48	0.23	0.002	0.02
Timing for hippocampus manipulation (min) ^c	0.38	0.14	- 0.01	0.09
pH	0.40	0.16	- 2.79	0.05
Excess base, mEq/L	0.36	0.13	- 0.05	0.08
O ₂ saturation, %	0.63	0.40	- 0.66	0.001
Time of samples freezing (months) ^c	0.75	0.57	- 0.02	< 0.0001
Succinato-Desidrogenase				
pH	0.33	0.11	- 6.76	0.11
PO ₂ , mmHg	0.34	0.12	- 0.00	0.10
O ₂ saturation, %	0.55	-1.68	0.30	0.006
Time of samples freezing (months) ^c	0.56	0.31	- 0.05	0.004

Complex IV

Hematocrit , %	0.36	0.13	0.07	0.10
Hemoglobin, g/dL	0.32	0.10	0.20	0.14

^a MAP: mean arterial pressure;

^b Time from anesthesia induction to middle temporal cortex resection

^c Storage time at -80C;

^d Time from last seizure to brain tissue sampling

^f Time from anesthesia induction to amygdala resection

^g Time from anesthesia induction to Hippocampus resection

Table IV: Predictive models of multiple linear regressions for each of the mitochondria chain respiratory enzymes in samples from the middle temporal neocortex, amygdala, and hippocampus.

Predictors variables	B coefficient	p value
TEMPORAL NEOCORTEX		
Complex I		
Constant	22625.4	0.01
MAP ^a (mmHg)	6.32	0.007
O ₂ saturation (%)	- 223.7	0.01
Linear regression coefficients: $r = 0.62$; $r^2 = 0.38$; $p = 0.008$		
Complex II		
Constant	2.34	< 0.001
Time of brain samples storage (months) ^b	- 0.03	< 0.001
Linear regression coefficients: $r = 0.82$; $r^2 = 0.71$; $p < 0.0001$		
Succinate-desidrogenase		
Constant	- 3.43	0.19
Anesthesia time until neocortex sampling (min)	0.01	0.02
Hemoglobin	0.38	0.02
Glucose	- 0.01	0.1
Linear regression coefficients: $r = 0.72$; $r^2 = 0.52$; $p = 0.01$		
Complex IV		
Constant	5.79	< 0.0001
Time of brain samples storage (months) ^b	- 0.06	0.05
Linear regression coefficients: $r = 0.39$; $r^2 = 0.15$; $p = 0.05$		
AMYGDALA		
Complex I		
Constant	729.8	< 0.0001
Time since the last seizure (hours) ^c	0.11	0.04
Linear regression coefficients: $r = 0.48$; $r^2 = 0.23$; $p = 0.04$		
Complex II		
Constant	2.33	0.52
Time of brain samples storage (months) ^b	- 0.02	0.03
Linear regression coefficients: $r = 0.65$; $r^2 = 0.41$; $p = 0.03$		
Succinate-desidrogenase		
Constant	4.36	< 0.0001
Time of brain samples storage (months) ^b	- 0.08	0.003
Linear regression coefficients: $r = 0.62$; $r^2 = 0.39$; $p < 0.003$		
Complex IV		
Constant	- 0.35	0.05
Time of Anesthesia (min) ^d	0.007	0.02

Linear regression coefficients: $r = 0.53$; $r^2 = 0.28$; $p = 0.02$

HIPPOCAMPUS

Complex I

Constant	709.7	< 0.0001
Time since the last seizure (hours) ^c	- 0.06	0.08

Linear regression coefficients: $r = 0.37$; $r^2 = 0.14$; $p = 0.08$

Complex II

Constant	34.5	< 0.04
Time of brain samples storage (months) ^b	- 0.02	0.01
O ₂ saturation (%)	- 0.33	0.05

Linear regression coefficients: $r = 0.80$; $r^2 = 0.64$; $p < 0.0001$

Succinate-desidrogenase

Constant	3.53	< 0.0001
Time of brain samples storage (months) ^b	- 0.05	0.004

Linear regression coefficients: $r = 0.56$; $r^2 = 0.31$; $p = 0.004$

Complex IV

Constant	0.75	0.61
Hemoglobin	0.07	0.10

Linear regression coefficients: $r = 0.36$; $r^2 = 0.13$; $p = 0.10$

^a MAP: mean arterial pressure;

^b Storage time;

^c Time from last seizure to brain tissue sampling;

^d Time from anesthesia induction to temporal neocortex sample collection (minutes).

ANEXO E - PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE PERÍODO DO DOUTORADO

Período: **Março de 2013 a Julho de 2015.**

Artigos Publicados:

1. de Faria Vieira FC, **Ronsoni MF**, Hohl A, Claudino LS, Diaz AP, Schwarzbold ML, Guarnieri R, Nunes JC, Lin K, Walz R. How predictable is the erectile function of patients with epilepsy? *Epilepsy & behavior* : E&B. 2015;47:61-5.
2. dos Santos HC, **Ronsoni MF**, Colombo BS, Oliveira CSS, Hohl A, Coral MHC, Sande-Lee S. Peripheral neuropathy scores in diabetic. *Revista Sociedade Brasileira de Clínica Médica*. 2015;13(1):40-5.
3. Fayad L, Narciso-Schiavon JL, Lazzarotto C, **Ronsoni MF**, Wildner LM, Bazzo ML, Schiavon LL, Dantas-Correa EB. The performance of prognostic models as predictors of mortality in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Annals of hepatology*. 2015;14(1):83-92.
4. Silva PE, Fayad L, Lazzarotto C, **Ronsoni MF**, Bazzo ML, Colombo BS, Dantas-Correa EB, Narciso-Schiavon JL, Schiavon LL. Single-centre validation of the EASL-CLIF consortium definition of acute-on-chronic liver failure and CLIF-SOFA for prediction of mortality in cirrhosis. *Liver international* : official journal of the International Association for the Study of the Liver. 2015;35(5):1516-23.
5. Becher TS, **Ronsoni MF**, Hohl A, Sande-Lee S. Metaboli outcomes of patients undergoing rouux-en-y gastric bypass in a University Hospita. *Clinical and Biomedical Research*. 2014;34(4):374-380.
6. Hohl A, **Ronsoni MF**, Oliveira M. Hirsutism: diagnosis and treatment. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2014;58(2):97-107.
7. Ventura A, **Ronsoni MF**, Shiozawa MB, Dantas-Correa EB, Canalli MH, Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL. Prevalence and clinical features of celiac disease in patients with autoimmune thyroiditis: cross-sectional study. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*. 2014;132(6):364-71.

8. Hohl A, **Ronsoni MF**, Debona R, Ben J, Schwarzbald ML, Diaz AP, Thais ME, Linhares MN, Latini A, Prediger RD, Pizzol FD, Walz R. Role of hormonal levels on hospital mortality for male patients with severe traumatic brain injury. *Brain injury*. 2014;28(10):1262-9.
9. Hohl A, **Ronsoni MF**, Sande-Lee S, de Faria Vieira FC, Schwarzbald ML, Diaz AP, Walz R. Androgens, male hypogonadism and traumatic brain injury. *Open Journal of Endocrine and Metabolic Disease*. 2014;4:13-23.
10. **Ronsoni MF**, Lazzarotto C, Fayad L, Silva MC, Nogueira CL, Bazzo ML, Narciso-Schiavon JL, Dantas-Correa EB, Schiavon LL. IGF-I and IGFBP-3 serum levels in patients hospitalized for complications of liver cirrhosis. *Annals of hepatology*. 2013;12(3):456-63.
11. Lazzarotto C, **Ronsoni MF**, Fayad L, Nogueira CL, Bazzo ML, Narciso-Schiavon JL, Schiavon LL, Dantas-Correa EB. Acute phase proteins for the diagnosis of bacterial infection and prediction of mortality in acute complications of cirrhosis. *Annals of hepatology*. 2013;12(4):599-607.

Artigos Aceitos para Publicação:

1. **Ronsoni MF**, Remor AP, Lopes MW, Leal RB, Schwarzbald ML, Hoeller AA, Carvalho CR, Ben J, Linhares MN, Lin K, Latini A, Walz R. Are mitochondrial parameters in the amygdala, hippocampus and temporal neocortex associated with seizure frequency in drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy patients? *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2015 (em prelo)
2. Silva NOE, **Ronsoni MF**, Colombo BS, Correa CG, Hatanaka SA, Canalli MHBS, Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL. Clinical and laboratory characteristics of patients with thyroid diseases with and without alanine aminotransferase levels above the upper tertile. Cross-sectional analytical study. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2015 (em prelo)
3. Hatanaka SA, Alcaire BP, **Ronsoni MF**, Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL. Type 1 diabetic adults should be screened for celiac autoimmunity. *Arab Journal of Gastroenterology*. 2015 (em prelo)

Artigos Submetidos:

1. **Ronsoni MF**, Remor AP, Lopes MW, Hohl A, Troncoso IHZ, Leal RB, Boos GL, Nunes JC, Linhares MN, Lin K, Latini A, Walz R. Mitochondrial respiration chain enzymatic activities in the human brain: methodological implications for tissue sampling and storage. *Journal of Neuroscience Methods*, 2015
2. **Ronsoni MF**, Remor AP, Lopes MW, Troncoso IHZ, Leal RB, Boos GL, Nunes JC, Linhares MN, Lin K, Latini A, Walz R. Does a single dose of dexamethasone affects mitochondrial respiration parameters of amygdala, cortex and hippocampus in humans? *Plos Medicine*, 2015.
3. Baseline characteristics and risk factors for ulceration, amputation and severe neuropathy in diabetic foot at risk: a multicenter study of 1455 patients. Cooperative Study on Ulceration, Severe Peripheral Neuropathy and Amputation (BRAZUPA). *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 2015.
4. Colombo BS, **Ronsoni MF**, Silva PE, Fayad L, Wildner LM, Bazzo ML, Dantas-Correa EB, Narciso-Schiavon JL, Schiavon LL. Prognostic significance of Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) serum levels in patients admitted for acute decompensating of cirrhosis. *Liver*, 2015.
5. Erbes JM, **Ronsoni MF**, Colombo BS, Correa CG, Hohl A, Sande-Lee S. Prevalence of thyroid autoimmunity in patients with type 1 diabetes followed at the University Hospital in Florianopolis. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, 2015.
6. Veiga FS, Elpo JA, Correa CG, De Nardin G, **Ronsoni MF**, Coral MHC, Hohl A, Sande-Lee S Serum 25(OH)-Vitamin D levels in patients with grade 2 and 3 obesity. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, 2015.