

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA

Leticia Coelho Silva

**SUMOILAÇÃO DE PROTEÍNAS NA EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL**

Florianópolis

2018

Leticia Coelho Silva

**SUMOILAÇÃO DE PROTEÍNAS NA EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL MESIAL**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmacologia
Orientador: Prof^a. Dr^a. Helena
Iturvides Cimarosti

Florianópolis
2018

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

Silva, Letícia Coelho
SUMOILAÇÃO DE PROTEÍNAS NA EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL MESIAL / Letícia Coelho Silva ;
orientadora, Helena Iturvides Cimarosti, 2018.
97 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

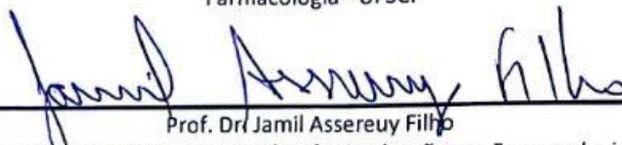
1. Farmacologia. 2. SUMOilação. 3. Modificações pós
traducionais. 4. Epilepsia. I. Cimarosti, Helena
Iturvides . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
III. Título.

"SUMOilação de proteínas na epilepsia do lobo temporal mesial"

Por

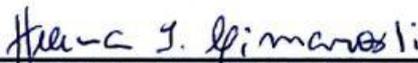
Leticia Coelho Silva

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (30/PPGFMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof. Dr. Jamil Assereuy Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr.ª Helena Ituirdes Cimarosti (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientadora



Dr.ª Manuella Pinto Kaster (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Daniel Santos Mansur (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por me guiar diante das oportunidades oferecidas.

Aos meus pais, Ana Maria e Nivaldo, por todo o amor, carinho, compreensão e apoio durante toda a caminhada. Obrigada pelo exemplo de vida.

À prof. Dr^a Helena, pela oportunidade do desenvolvimento do trabalho. Agradeço pela orientação, ensinamentos e incentivo tanto no âmbito profissional quanto pessoal.

À minha irmã, Nayara, pela companhia nas horas tristes e felizes, pelas risadas e pelo consolo, por ser meu ombro amigo.

Ao meu namorado Matheus, por todo o amor e companheirismo, que mesmo à distância se faz presente em todos os momentos importantes da minha vida.

À toda minha família, pelo incentivo, carinho e apoio.

Às meninas do LINQ, em especial Camila e Stella, companheiras, amigas e conselheiras científicas e da vida.

Ao prof. Dr. Roger Walz, pela oportunidade e fornecimento de amostras para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Mark, pela ajuda e fornecimento das amostras do modelo experimental.

À Leandra, pela companhia e auxílio no preparo das amostras utilizadas no trabalho.

Ao Marcelo, agradeço imensamente por todo o auxílio, ideias e paciência no desenvolvimento dos dados *in silico*, e programação.

Aos professores, Dr. Daniel Mansur, Dr^a Manuella Kaster, Dr^a Thereza Christina Monteiro de Lima, por aceitarem o convite para avaliar este trabalho.

Aos professores do PPGFMC, pelos ensinamentos e contribuição para minha formação.

Aos colegas do PPGFMC, cujo apoio e amizade foram fundamentais ao longo deste período.

A todos os funcionários do departamento de Farmacologia, pelo auxílio e serviços prestados.

À equipe do LAMEB, pelos ensinamentos e disponibilidade para utilização dos equipamentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para meu aprendizado científico e me apoiaram neste trajeto.

RESUMO

A SUMOilação é uma modificação pós-traducional (MPT) que, através da ligação covalente de SUMO à proteína alvo, pode alterar as interações moleculares destes substratos proteicos e, conseqüentemente, modular sua atividade, estabilidade e/ou localização subcelular. Recentemente esta MPT foi identificada como um mecanismo crucial para regulação da permeabilidade dos canais iônicos e, também foi demonstrado que poderia desempenhar papel no início das crises espontâneas e da morte súbita na epilepsia. A epilepsia é uma doença neurológica de alta prevalência, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. Esta condição é caracterizada pela desregulação nos mecanismos que controlam a atividade e/ou disparo neuronal. O tipo de epilepsia mais comum em adultos é a epilepsia do lobo temporal (ELT), e entre os pacientes com ELT, há o subtipo mesial relacionado à esclerose do hipocampo (ELTM-EH). Esses pacientes apresentam resistência a drogas, comprometimento psiquiátrico e alterações neuroquímicas. Desta forma, são normalmente encaminhados para cirurgia na qual é realizada a retirada do foco epileptogênico, na tentativa de conter as crises epilépticas. Há pouca informação sobre os mecanismos desta patologia e as intervenções disponíveis atualmente apresentam apenas efeito na contenção das crises epilépticas já estabelecidas, ao invés de prevenir o desenvolvimento da epilepsia. Portanto, é necessário compreender a patogênese da doença e caracterizar processos que possam contribuir para o desenvolvimento e/ou participar desta patologia. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi determinar os perfis de SUMOilação, em um modelo animal de ELTM-EH e em amostras de pacientes com ELTM-EH, além de caracterizar o perfil transcricional de SUMOilação nestas condições. Nossos resultados demonstraram que é necessário utilizar o inibidor da deSUMOilação, NEM para estudar esta MPT. Também foi encontrado que o perfil de SUMOilação não difere entre as estruturas (córtex, amígdala, hipocampo) obtidas da lobectomia temporal anterior-mesial de pacientes com ELTM-EH. Foram caracterizadas as proteínas que são passíveis de serem SUMOiladas no cérebro humano. No modelo *in silico*, encontramos genes diferencialmente expressos que codificam proteínas que são passíveis de serem SUMOiladas, e que SUMO-1, SUMO2/3 e enzimas que compõe este processo estariam aumentados nesta doença. Portanto, nossos resultados apresentam evidências de que a SUMOilação poderia estar alterada na epilepsia, podendo ser útil para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou identificação da doença.

Palavras-chave: Alterações neuroquímicas. Epileptogênese.
Modificação pós-traducional.

ABSTRACT

SUMOylation is a post-translational modification (PTM) that through the covalent attachment of SUMO to the target protein can alter molecular interactions of substrates and, consequently, modulate their activity, stability and/or subcellular localization. Also, it has recently been identified as a crucial mechanism regulating the permeability of ion channels and to play a role in the onset of spontaneous crises and sudden death in epilepsy. Epilepsy is a common neurological condition that affects millions of people worldwide characterized by a breakdown in the mechanisms that normally constrain neuronal activation and/or firing. The most common type of epilepsy in adults is the temporal lobe epilepsy (TLE) and among TLE patients there is the mesial subtype related to hippocampal sclerosis (MTLE-HS). These patients show drug resistance, psychiatric impairment and neurochemical changes. Thus, they are usually subjected to surgery in order to remove the epileptogenic focus in an attempt to contain epileptic seizures. There is little information about the mechanisms underlying this pathology and the currently available interventions act to restrain epileptic seizures in an already established fashion, rather than preventing the development of epilepsy. Therefore, it is necessary to understand the pathogenesis of epilepsy and characterize processes that may contribute to the development and / or that participate in this pathology. Thus, our goal is to determine the SUMOylation profiles in an animal model of MTLE-HS and human samples from patients suffering from MTLE-HS, as well as characterizing the transcriptional profile of SUMOylation in these conditions. Our results demonstrated that it is necessary to use the deSUMOylation inhibitor, NEM to study this PTM. It has also been found that the SUMOylation profile does not differ significantly between the structures (cortex, amygdala, hippocampus) obtained from the anterior-mesial temporal lobectomy of patients with MTLE-HS. Proteins that are likely to be SUMOylated in the human brain have been characterized. In the *in silico* model, we found differentially expressed genes that encode proteins that are likely to be SUMOylated, and that SUMO-1, SUMO2/3 and enzymes of the SUMOylation pathway could be increased in this disease. Therefore, our results provide evidence that SUMOylation could be altered in epilepsy, and may be useful for the development of new drugs and/or in order to identify the disease.

Keywords: Epileptogenesis. Neurochemical changes. Post-translational modification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de crises epiléticas.	22
Figura 2 - Definição de epilepsia refratária.	28
Figura 3 - Via da SUMOilação.....	32
Figura 4 - Eletroforese, eletrotransferência e imunodeteccção.	42
Figura 5 - Perfil de SUMOilação de proteínas em amostras de hipocampo de pacientes com ELTM-EH utilizando do inibidor NEM.....	45
Figura 6 - Análise das membranas incubadas com SUMO-1 e SUMO-2/3 de pacientes com ELTM-EH.....	46
Figura 7 - Análise das ontologias enriquecidas para os genes <i>up-regulados</i> ..	51
Figura 8 - Análise das ontologias enriquecidas para os genes <i>down-regulados</i>	53
Figura 9 - Níveis globais da SUMOilação de proteínas no modelo crônico de epilepsia induzido pela pilocarpina.	89
Figura 10 - Utilização do inibidor NEM e alteração no perfil de SUMOilação de proteínas em amostras de hipocampo de animais.....	90
Figura 11 - O inibidor NEM previne a deSUMOilação.	91
Figura 12 – Perfil total e estratificado da SUMOilação por SUMO-1 na amígdala, córtex e hipocampo de pacientes com ELTM-EH.....	93
Figura 13 - Perfil total e estratificado da SUMOilação por SUMO-2/3 na amígdala, córtex e hipocampo de pacientes com ELTM-EH.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de anticorpos utilizados para WB.....	42
Tabela 2 - Perfil de SUMOilação por SUMO-1 das estruturas de pacientes ELTM-EH fármacos-resistentes.	47
Tabela 3 - Perfil de SUMOilação por SUMO-2/3 das estruturas de pacientes ELTM-EH fármacos-resistentes.	48
Tabela 4 - Ontologias enriquecidas para os genes <i>up</i> -regulados.....	50
Tabela 5 - Ontologias enriquecidas para os genes <i>down</i> -regulados	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPA – Ácido α -amino-3-hidróxido-5-metil-4-isoxazol-propiónico
- BDZ – Benzodiazepínico
- CASK – Cálcio/Calmodulina-dependente de serina quinase (do inglês, *Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase*)
- DAE – Drogas antiepilépticas
- EEG – Registros eletroencefalográficos
- ELT – Epilepsia do lobo temporal
- ELTM – Epilepsia do lobo temporal mesial
- ELTM-EH – Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo
- GABA – Ácido gama aminobutírico
- GO – Ontologia Gênica (do inglês, *Gene Ontology*)
- ILAE – Liga Internacional Contra a Epilepsia (do inglês, *International League Against Epilepsy*)
- KA – Ácido cáínico
- LTD – Depressão de Longa Duração (do inglês, *Long-term Depression*)
- LTP – Potenciação de Longa Duração (do inglês, *Long-term Potentiation*)
- MAGUK – Guanilato quinase associada à membrana (do inglês, *Membrane-associated guanylate kinase*)
- MEF2A – Fatores de transcrição ativadores de miócito 2 (do inglês, *Myocyte-enhancer factor 2*)
- MPTs – Modificações pós-traducionais
- NIIDS – Instituto Nacional de Desordens Neurológicas e acidente vascular encefálico (do inglês, *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*)
- NMDA – N-metil-D-aspartato
- RIM1 α – Molécula de interação com a Rab3a
- SE – Estado de Mal Epiléptico (do inglês, *Status Epilepticus*)
- SENP – Sentrina-protease (do inglês, *Sentrin-specific proteases*)
- SNARE – Proteínas de Ligação ao Fator Solúvel Sensível a N-Etilmaleimida (do inglês, *N-ethylmaleimide sensitive factor-attachment protein receptor*)
- SNC – Sistema nervoso central
- SUMO – Pequena proteína similar à ubiquitina (do inglês, *Small ubiquitin-like modifier*)
- SYNIA – Sinapsina Ia (do inglês, *Synapsin Ia*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	EPILEPSIA: HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO	20
1.2	ICTOGÊNESE E EPILEPTOGÊNESE	23
1.3	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	26
1.4	EPILEPSIA REFRACTÁRIA: HISTÓRICO E DEFINIÇÃO	27
1.5	EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL	29
1.6	SUMOILAÇÃO	30
1.7	SUMOILAÇÃO E FUNÇÃO SINÁPTICA	33
2	JUSTIFICATIVA	37
3	HIPÓTESE	37
4	OBJETIVOS	37
4.1	OBJETIVO GERAL:	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	37
5	METODOLOGIA	38
5.1	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	38
5.1.1	Animais	38
5.1.2	Pacientes	38
5.2	ANÁLISES NEUROQUÍMICAS.....	39
5.2.1	Preparo das amostras	39
5.2.2	Eletroforese e eletrotransferência	40
5.2.3	Imunodeteccção	40
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5.4	ANÁLISE IN SILICO DO PERFIL DE SUMOILAÇÃO PROTEICA EM HUMANOS	43
5.5	ANÁLISE DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS QUE PODEM SER SUMOILADOS E IDENTIFICAÇÃO DE ONTOLOGIAS.....	43
6	RESULTADOS	45
6.1	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUMOILAÇÃO EM AMOSTRAS DE CÓRTEX, AMÍGDALA E HIPOCAMPO DE PACIENTES COM ELTM-EH.....	45

6.2	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	49
6.2.1	Análise <i>in silico</i> do perfil de SUMOilação proteica em humanos	49
6.2.2	Análise de genes diferencialmente expressos que codificam proteínas que podem ser SUMOiladas e identificação de ontologias	49
7	DISCUSSÃO	54
8	CONCLUSÃO.....	58
9	PERSPECTIVAS.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICE A – Modelo experimental da ELTM: utilização da pilocarpina.....	87
	APÊNDICE B – Perfil de SUMOilação por SUMO-1 e SUMO-2/3 das estruturas de pacientes ELTM-EH fármacos-resistentes.....	93
	APÊNDICE C – Proteínas SUMOiladas no cérebro humano	95
	APÊNDICE D – Genes diferencialmente expressos na ELTM-EH	96
	ANEXO A – Artigo científico relacionado a dissertação.	97

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que o sistema nervoso central (SNC) de um indivíduo adulto seja composto por aproximadamente 86 bilhões de neurônios (Azevedo et al., 2009). A propagação da informação e comunicação neuronal é predominantemente feita através da sinapse química (Südhof, 1995). As sinapses químicas são caracterizadas pela transdução de sinais através de mediadores químicos, sendo eles excitatórios (com o glutamato como o principal neurotransmissor excitatório) ou inibitórios (com o ácido gama aminobutírico, GABA, como o principal neurotransmissor inibitório) (Fogarty et al., 2016).

Acredita-se que ocorram 100 trilhões de sinapses no cérebro humano (Azevedo et al., 2009). Cada sinapse corresponde a uma junção especializada na qual a célula pré-sináptica conta com uma maquinaria para liberação do neurotransmissor e a célula pós-sináptica recruta componentes para receber e integrar este sinal (Südhof, 2013). É um processo de alta organização e complexidade que engloba o envolvimento de diversas proteínas e estruturas que devem ser precisamente reguladas (Katz e Miledi, 1967; Rizzoli e Betz, 2005; Wilhelm et al., 2014).

De maneira geral, para que a neurotransmissão ocorra é necessário a propagação do potencial de ação através do neurônio pré-sináptico. O potencial de ação origina-se devido a uma perturbação do estado de repouso da membrana celular, com conseqüente fluxo de íons por meio da membrana e alteração da concentração iônica nos meios intra e extracelular (Eccles, 1990). Ao atingir o terminal pré-sináptico, o potencial de ação promove a abertura dos canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem (Südhof, 1995; Rizzoli e Betz, 2005; Südhof, 2013). A entrada de Ca^{2+} possibilita a fusão das vesículas sinápticas contendo neurotransmissores com a membrana pré-sináptica. O complexo de proteínas de ligação ao fator solúvel sensível à N-etilmaleimida (SNARE, do inglês *N-ethylmaleimide sensitive factor-attachment protein receptor*) auxilia nesta fusão, conseqüentemente permitindo liberação do conteúdo para a fenda sináptica (Südhof, 1995).

Desta forma, as vesículas sinápticas estão em constante e dinâmico ciclo de fusão com a membrana plasmática neuronal e endocitose, para manter a integridade estrutural e funcional dos terminais pré-sinápticos em que residem. Assim, garantem a rápida transmissão de informação requerida pela atividade cerebral (Katz, 1969; Rizzoli e Betz, 2005). Este processo também exhibe plasticidade, na qual ocorre modificação da

função sináptica juntamente com as estruturas envolvidas na sinapse em resposta à atividade (Katz e Miledi, 1967). Desta forma, a plasticidade sináptica corresponde à capacidade de modificação na eficiência da neurotransmissão, em resposta à atividade neural gerada por estímulos, seja pelo aumento ou diminuição da resposta pós-sináptica (Citri e Malenka, 2008).

Em um modelo de sinapse tridimensional, foi possível estimar cerca de 300.000 proteínas compondo este evento biológico (Wilhelm et al., 2014). Estas proteínas modulam tanto os eventos de neurotransmissão como de plasticidade sináptica. Desta forma, exigem uma rápida e precisa regulação das interações entre elas, normalmente coordenadas por modificações pós-traducionais (MPTs) (Yokoi et al., 2012).

As MPTs referem-se a alterações químicas que podem ocorrer na proteína após sua tradução (Walsh et al., 2005). Estas modificações são predominantemente catalisadas por enzimas que reconhecem sequências consenso em resíduos de aminoácidos em alvos específicos (Knorre et al., 2009; Prabakaran et al., 2012). Após o reconhecimento da proteína a ser modificada, ocorre a ligação covalente seja de grupamentos químicos, lipídios, açúcares ou outras proteínas levando a diversas consequências e alterações na proteína alvo (Deribe et al., 2010; Duan e Walther, 2015). Estas alterações envolvem desde a regulação da estrutura da proteína (Henley et al., 2014) a cascatas de sinalização (Yang, 2004) e degradação (Hershko e Ciechanover, 1998). Este tipo de modificação permite o controle rápido e de baixo gasto energético, pois além de algumas MPTs serem facilmente reversíveis pela ação de enzimas de desconjugação específicas, um controle similar por degradação proteica e síntese consumiria mais tempo e demandaria um maior investimento bioenergético (Walsh et al., 2005). Desta forma, estas MPTs são consideradas cruciais para a regulação da função proteica de forma espacial e temporal (Kaminski e Henley, 2007).

A perda ou alterações estruturais da sinapse podem resultar em disfunção na neurotransmissão e consequentemente implicar em diversos distúrbios neurológicos, como por exemplo, a epilepsia (Chung e Raingo, 2013). Desta maneira, o presente trabalho teve como objetivo investigar o perfil de uma MPT específica conhecida como SUMOilação em pacientes, e no modelo experimental de epilepsia do lobo temporal mesial (Apêndice A).

1.1 EPILEPSIA: HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO

A epilepsia é caracterizada como uma das doenças neurológicas de maior prevalência, atingindo cerca de 65 milhões de pessoas no mundo (Ngugi *et al.*, 2010). A palavra epilepsia tem origem grega, derivada do verbo "*epilambanein*", cujo significado é "ser agarrado", "ser atacado" ou "ser tomado por", devido às consequências comportamentais nos indivíduos que acomete. A primeira descrição formal da epilepsia como doença ocorreu em 400 a.C. por Hipócrates (Hippocrate, 1849). Apenas por volta do século XIX houve melhor entendimento da epileptologia (causas e consequências da epilepsia), com os trabalhos de John Hughlings Jackson (Chaudhary *et al.*, 2011).

Em 2005, a definição de epilepsia foi proposta pela Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE, do inglês *International League Against Epilepsy*) como uma perturbação cerebral caracterizada por uma predisposição persistente a crises epiléticas, e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, sociais e psicológicas desta condição (Fisher *et al.*, 2005). Esta definição preconiza a ocorrência de, pelo menos, uma crise epilética em associação com alterações cerebrais que predisõem ao início de outras crises (Fisher *et al.*, 2005).

É comumente aceito que as crises epiléticas surgem a partir do desequilíbrio entre excitação e inibição da neurotransmissão, favorecendo a excitação neuronal. Apesar da etiologia não ser totalmente elucidada e depender de diversos mecanismos, as crises epiléticas são caracterizadas pela alteração encefálica resultante das descargas excessivas de potenciais de ação e conseqüente disparo neuronal exacerbado (Scharfman, 2007). Desta forma, a crise epilética é definida pela ILAE como "ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas secundários à atividade neuronal cerebral anormal excessiva ou síncrona" (Fisher *et al.*, 2005). Ainda não é possível classificar as crises epiléticas apenas com base em critérios científicos, devido à falta de dados e conhecimento sobre os mecanismos desta doença (Fisher, 2017; Fisher *et al.*, 2017). Segundo a mais nova proposta da ILAE, as crises epiléticas podem ser classificadas em crises focais, crises generalizadas e crises de início desconhecido (Figura 1) (Engel, 2006; Berg *et al.*, 2010; Fisher *et al.*, 2017).

As crises de início focal são assim nomeadas, pois correspondem ao comprometimento de uma região delimitada de um hemisfério cerebral (Fisher *et al.*, 1981; Fisher, 2017; Fisher *et al.*, 2017). Os sintomas apresentados pelo indivíduo correspondem à área cerebral afetada. Desta forma, variam conforme a região do encéfalo onde as crises se originam. Por exemplo, no caso do envolvimento de estruturas do lobo frontal pode ocorrer prejuízo em funções executivas (cognição, planejamento), e memória no caso temporal (hipocampo, córtex entorrinal, perirrinal e

temporal), podendo ocorrer ainda perda de consciência. Portanto, este tipo de crise ainda pode ser subdividido em **crise focal perceptiva** e **crise focal disperceptiva** com comprometimento ou não da percepção, respectivamente. Posteriormente, podem ainda ser classificadas de acordo com sintomas **motores** (caso ocorra primeiramente sintomas motores durante a crise, como por exemplo, automatismos) e **não motores** (ocorre primeiramente mudanças nas sensações, emoções), refletindo o primeiro sinal ou sintoma da crise. Ainda podem ser classificadas como **focal evoluindo para tônico-clônico bilateral**. Este tipo caracteriza-se pelo início em um hemisfério, ou seja, inicia de forma focal, e se propaga para ambos os hemisférios.

Já as crises generalizadas correspondem ao comprometimento simultâneo de ambos os hemisférios cerebrais, havendo comumente perda da consciência, pois o comprometimento ocorre em todo o encéfalo, inclusive na formação reticular. Logo, são divididas apenas em crises **motoras** (tônico-clônicas, outros tipos) e **não motoras** (ausência). O termo popular convulsão, refere-se à observação da atividade motora durante uma crise. Normalmente é associada à crise tônico- (contração muscular mantida durante segundos a minutos) clônica (depois de cada contração muscular há relaxamento, ocasionando abalos musculares sucessivos) (Fisher *et al.*, 2017).

As crises de início desconhecido podem ser classificadas por características adicionais ao seu desenvolvimento, incluindo **motoras**, **não motoras** ou **não classificadas** devido à informação inadequada ou impossibilidade de inseri-las em outras categorias (Fisher *et al.*, 1981; Fisher, 2017; Fisher *et al.*, 2017).

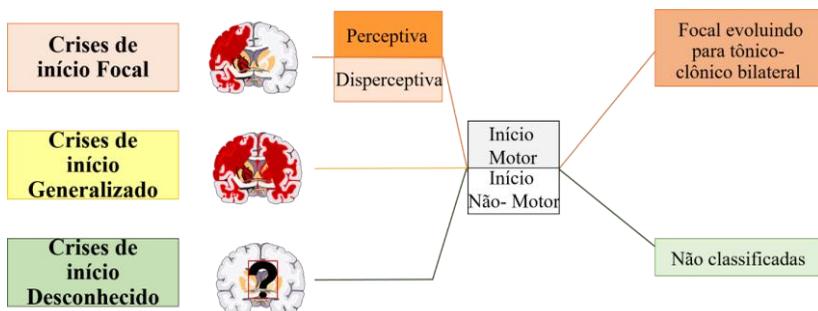


Figura 1 - Tipos de crises epiléticas. As crises epiléticas podem ser divididas em crises de início focal, generalizado e desconhecido. A crise de início focal ainda pode ser subdividida em perceptiva/disperceptiva, início motor/início não-motor e focal evoluindo para tônico-clônico bilateral (linha alaranjada). A crise

de início generalizado pode ser subdividida em início motor/início não-motor (linha amarela). As crises de início desconhecido podem ser classificadas em início motor/início não-motor, ou não classificadas (linha esverdeada). Adaptado de Siegel e colaboradores (2017).

A falta de compreensão a respeito de diversos aspectos desta doença, como diagnóstico, tratamento e fisiopatologia, caracteriza-a como de alta complexidade (Keezer *et al.*, 2016). Pode-se perceber que as crises epiléticas não partilham da mesma patogênese apesar de culminarem no desequilíbrio da excitabilidade neuronal. Desta forma, os diferentes tipos de epilepsia podem ser agrupados em diferentes síndromes de acordo com um grupo de características clínicas que ocorrem simultaneamente com tipos de crises similares, idade do aparecimento das crises, registros eletroencefalográficos (EEGs), genética, prognóstico e resposta a drogas antiepiléticas (DAEs), refletindo em diferentes padrões de sua fisiopatologia (Fisher *et al.*, 2017).

Em 2014, com o objetivo de facilitar o diagnóstico clínico, o conceito de epilepsia foi redefinido para prática clínica como uma doença cerebral caracterizada por uma das seguintes condições: pelo menos duas crises não provocadas por estímulo externo, ou duas crises reflexas ocorrendo em um intervalo superior a 24 h; uma crise não provocada ou uma crise reflexa quando há chance de ocorrência de uma nova crise estimada em pelo menos 60%, ou quando diagnosticada uma síndrome epilética (Fisher *et al.*, 2014). A ocorrência da crise reflexa refere-se à crise provocada por estímulo específico (seja ele simples como um lampejo luminoso, ou elaborado como uma música) ou atividade do indivíduo (também podendo ser desde um simples movimento, a uma atividade complexa como jogar xadrez, ou ambos, como ler em voz alta) (Blume *et al.*, 2001).

Assim, não há como generalizar os conhecimentos obtidos a respeito de um tipo de epilepsia para os demais tipos existentes (Berg *et al.*, 2010; Stafstrom e Carmant, 2015).

1.2 ICTOGÊNESE E EPILEPTOGÊNESE

O termo ictogênese refere-se ao mecanismo de aparecimento de crises epiléticas (Scharfman, 2007). Como discutido no tópico anterior, estas podem apresentar diversas causas, porém surgem quando há uma ruptura de mecanismos que normalmente criam um equilíbrio entre excitação e inibição da neurotransmissão (Somjen, 2002). Apesar deste

conceito se apresentar de forma fácil e aplicável, sabe-se que os mecanismos de geração das crises epiléticas não foram completamente caracterizados. A dificuldade em elucidar este processo consiste na falta de compreensão do equilíbrio da comunicação neuronal. Esta regulação parece ocorrer em diferentes “níveis” do SNC, compreendendo desde moléculas básicas, como proteínas e componentes de membranas, a células e circuitos/sinapses, até complexas redes neuronais de grande escala (Scharfman, 2007).

Faz-se importante ressaltar a função dos gradientes químicos e elétricos para manutenção da atividade elétrica, a nível proteico e de membrana celular. A permeabilidade da membrana a diferentes íons, principalmente sódio (Na^+) e potássio (K^+) e a ação dos canais dependente de voltagem, juntamente com a bomba de Na^+/K^+ ATPase permitem a manutenção dos diferentes gradientes e a capacidade de rápida despolarização e repolarização neuronal (McCormick e Huguenard, 1994). A regulação dos canais envolvidos no controle das correntes de Ca^{2+} também demonstra extrema importância, dado que esse íon é importante tanto modulando diversas vias celulares como segundo mensageiro, quanto exercendo um papel principal no desencadeamento de eventos como a excitotoxicidade glutamatérgica (Armijo *et al.*, 2005). As disfunções destas etapas podem levar ao desequilíbrio e atividade neuronal anormal em diversas maneiras (Somjen, 2002). O bloqueio da bomba Na^+/K^+ ATPase pode levar à atividade convulsiva (Grisar *et al.*, 1992; Vaillend *et al.*, 2002). O aumento do K^+ extracelular pode desencadear a despolarização neuronal exacerbada. Além disso, anormalidades nos canais de Na^+ podem levar a uma diminuição do limiar para um potencial de ação (Meisler *et al.*, 2010). Mutações em alguns destes genes, como SCN1A, que codifica o canal de sódio dependente de voltagem Nav1.1 (responsável por regular a troca de sódio entre espaços intra- e extracelulares), têm sido relacionadas com síndromes específicas (Meisler *et al.*, 2001; Meisler *et al.*, 2010). Também já foi demonstrado, que animais *knock-out* para os canais de Ca^{2+} dependente de voltagem do tipo $\text{Ca}_v2.3$, são resistentes para o desenvolvimento de crises epiléticas induzidas pela administração de cainato (Weiergräber *et al.*, 2007; Dibué-Adjei *et al.*, 2017).

Em relação à manutenção das sinapses, temos importante atuação dos principais neurotransmissores que participam da transmissão sináptica excitatória e inibitória no SNC, os aminoácidos glutamato e GABA, respectivamente (Bloom, 1999). O GABA exerce as suas ações inibitórias especialmente através dos receptores GABA_A ionotrópico e GABA_B metabotrópico. Já os efeitos excitatórios do glutamato são

mediados pelos receptores ionotrópicos: ácido α -amino-3-hidróxido-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), ácido cáñico (KA, do inglês *kainic acid*) e N-metil-D-aspartato (NMDA), e por receptores metabotrópicos (Sanderson e Dell'acqua, 2011). A neurotransmissão mediada pelos receptores ionotrópicos afeta diretamente o fluxo de íons e o estado eletroquímico da membrana pós-sináptica, portanto é realizada de forma rápida (Bowie, 2008). É possível a existência de diversos subtipos de receptores conforme a combinação das diferentes subunidades que os formam. Esta variação confere distintas funcionalidades para os diversos tipos de receptores, pois apresentam permeabilidades diferentes aos íons (Bowie, 2008; Weilinger *et al.*, 2013). Já os receptores metabotrópicos coordenam a resposta pós-sináptica de forma mais lenta, pois são acoplados a proteínas G e participam dos mecanismos de resposta intracelular através da ativação de segundos mensageiros (Pinheiro e Mulle, 2008). Desta forma, qualquer mudança estrutural e/ou entre neurotransmissão mediada por GABA ou glutamato favorecendo a excitação neuronal, pode desencadear crises epilépticas. As respostas auto-imunes e a inflamação, também têm sido cada vez mais relacionadas em desempenhar importante papel na geração e propagação das crises. Diversos auto-anticorpos para os canais iônicos envolvidos na excitação e inibição neuronal, incluindo canais de K^+ e Ca^{2+} dependente de voltagem (Mcknight *et al.*, 2005), receptores NMDA (Niehusmann *et al.*, 2009) e receptores GABA_B foram identificados em pacientes com crises epilépticas de etiologia desconhecida (Lancaster *et al.*, 2010).

A sincronização das redes neuronais complexas nas crises epilépticas pode ocorrer de diversas formas, desde a propagação através das junções comunicantes entre os neurônios e células gliais (Traub *et al.*, 2004; Voss *et al.*, 2009), falhas no circuito inibitório (Cobb *et al.*, 1995) ou através das próprias alterações plásticas que ocorrem em indivíduos com epilepsia (Sutula e Dudek, 2007). Cabe ressaltar esse último exemplo, pois essas mudanças e reorganizações sinápticas não só contribuem com a sincronização das redes neuronais, como também com o processo de epileptogênese, que consiste no processo de modificação de um cérebro saudável para aquele que inicia o desenvolvimento da epilepsia (Sutula e Dudek, 2007).

Diferindo do conceito anterior de ictogênese, a epileptogênese caracteriza-se pela reorganização dos circuitos cerebrais que, com o decorrer do tempo, transformam-se em um foco gerador de descargas epilépticas (Scharfman, 2007). Por exemplo, após certo tempo da ocorrência de lesões do tecido cerebral (como traumatismo ou acidente

vascular), alguns indivíduos poderão desenvolver epilepsia. Assim, a epileptogênese é o processo pelo qual um cérebro previamente assintomático torna-se capaz de gerar crises epilépticas espontâneas (Silva e Cabral, 2008).

Os mecanismos envolvidos neste processo não são completamente elucidados. Porém, resultam em hiperexcitabilidade e morte neuronal e incluem diversos marcadores como gliose e reorganização da rede neural (Sloviter, 1999; Pitkänen *et al.*, 2002; Shapiro *et al.*, 2008). Da mesma forma, a hiperexcitabilidade é obtida e instalada através do excesso de despolarização neuronal, o que resulta em liberação anormal de neurotransmissores e excessivas descargas de potenciais de ação (Scharfman, 2007). Sugere-se que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial também contribuam para o surgimento destes processos (Waldbaum e Patel, 2010).

1.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Até metade do século XIX o tratamento para a epilepsia baseava-se principalmente no uso de substâncias fitoterápicas, e pouco era conhecido sobre algumas substâncias químicas (Adams *et al.*, 2012). Em 1857, foi identificado o efeito sedativo e anticonvulsivante do brometo de potássio (Sieveking, 1857). Apesar da sua toxicidade, ele foi utilizado até 1912, quando foi observado o efeito do fenobarbital na redução da frequência das crises epilépticas (Hauptmann, 1912). A ação anticonvulsivante da fenitoína, que foi demonstrada primeiramente em animais de laboratório, ao contrário do brometo de potássio e do fenobarbital, ocorreu em 1937. Assim, com a utilização de modelos experimentais, foi possível o desenvolvimento de metodologias de indução de crises e aprimoramento da busca de fármacos associados ao efeito anticonvulsivante (Krall *et al.*, 1978).

Em 1975, com o surgimento do Programa de Desenvolvimento de Drogas Antiepilépticas pelo Instituto Nacional de Desordens Neurológicas e acidente vascular encefálico (*National Institute of Neurological Disorders and Stroke*, NIIDS), nos Estados Unidos, iniciou-se a era moderna da elaboração de fármacos antiepilépticos. A partir deste momento, diversos medicamentos têm surgido, partilhando de mecanismos de ação similares que visam promover a diminuição da excitação ou o aumento da inibição neuronal. Os processos farmacológicos desses medicamentos, incluem a modulação de canais iônicos dependente de voltagem, aumento da atividade GABAérgica,

inibição da transmissão glutamatérgica e modificação da liberação de neurotransmissores (Kwan e Brodie, 2007).

Alguns fármacos como valproato, lamotrigina, carbamazepina, fenitoína, oxcarbazepina e eslicarbazepina atuam de forma a manter o canal de Na^+ no estado inativado. O fármaco lacosamida parece afetar seletivamente a inativação lenta do canal de Na^+ , enquanto que, outros bloqueadores do canal de Na^+ modulam a inativação rápida (Beydoun *et al.*, 2009). Apesar do mecanismo não ser elucidado, as drogas felbamato, topiramato, zonisamida e rufinamida também parecem atuar em canais de Na^+ (Rogawski e Löscher, 2004; Brodie *et al.*, 2009). Outros antiepilépticos como etosuximide, gabapentina e pregabalina atuam inibindo os canais de Ca^{2+} dependente de voltagem, desta forma prevenindo a despolarização e liberação do neurotransmissor (Korinthenberg *et al.*, 2007; Meldrum e Rogawski, 2007). A lamotrigina, topiramato, levetiracetam e zonisamida também parecem interagir com os canais de Ca^{2+} (Martin *et al.*, 2002; Meldrum e Rogawski, 2007). Ainda, podem atuar no receptor GABA_A , de forma a aumentar ação do receptor (barbitúricos, benzodiazepínicos), alterar síntese (valproato de sódio), metabolismo (vigabatrina) ou recaptção sináptica de GABA (tiagabina) (Sills e Brodie, 2001; Kwan e Brodie, 2006). Já os fármacos felbamato, topiramato e zonisamida ainda podem atuar em subtipos do receptor de glutamato, levando à redução da neurotransmissão excitatória rápida (Meldrum e Rogawski, 2007).

Enquanto, os fármacos permitem o controle sintomático das crises, a epilepsia permanece incurável, em parte devido à má compreensão das bases moleculares e eletrofisiológicas de seu desenvolvimento. Além disso, 30% dos indivíduos que apresentam epilepsia são refratários ao tratamento farmacológico (Fisher *et al.*, 2014). Dessa forma, avanços na compreensão dessa patologia são cruciais para a descoberta de tratamentos eficazes, não só para a epilepsia como para distúrbios cerebrais relacionados.

1.4 EPILEPSIA REFROTÁRIA: HISTÓRICO E DEFINIÇÃO

Entende-se por epilepsia refratária, aquela caracterizada por crises epilépticas persistentes que, mesmo com a utilização de anticonvulsivantes, a ausência de crises é improvável de ser obtida. Com intuito de facilitar a pesquisa, encontrar um tratamento eficaz e direcionado às características particulares dos pacientes, a ILAE publicou a definição consenso de epilepsia fármaco-resistente. A determinação deste conceito, também possibilita a identificação e delimitação das

síndromes associadas com resistência aos medicamentos (Kwan *et al.*, 2010).

Esta nova definição de epilepsia resistente ao tratamento abrange dois níveis hierárquicos. O nível 1 fornece uma abordagem geral para categorizar as intervenções, sejam elas farmacológicas ou não. Desta forma é possível analisar e categorizar quanto: a liberdade de crises epiléticas (ou seja, a ausência de crises), falha no tratamento, ou indeterminado (caso a intervenção não seja adequada em relação ao tempo de uso, ou dose utilizada; e apropriada, referindo-se a droga efetiva para o tipo de epilepsia do paciente). Assim, o nível 1 fornece a base para as determinações de nível 2, que formam a definição do núcleo de epilepsia resistente aos medicamentos baseado na relação de tratamentos que resultaram em falha (Figura 2). Desta forma, a resistência ao tratamento fica definida como falha do tratamento adequado de dois antiepiléticos toleráveis e escolhidos apropriadamente e, utilizados em monoterapia ou combinação, para atingir ausência duradoura de crises (Kwan *et al.*, 2010). Sendo importante ressaltar que o principal resultado clínico esperado ao se tratar um paciente com epilepsia, é a ausência de crises epiléticas ao longo da vida, sem efeitos adversos (Vickrey *et al.*, 1995; Sillanpää *et al.*, 2004; Jacoby *et al.*, 2007; Téllez-Zenteno *et al.*, 2007).

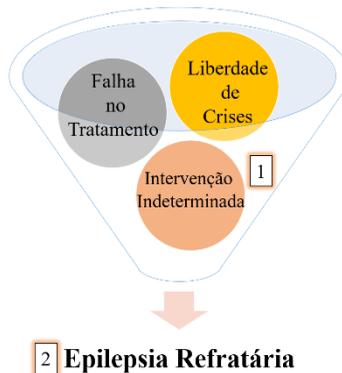


Figura 2 - Definição de epilepsia refratária. A epilepsia refratária pode ser categorizada de acordo com: liberdade de crises epiléticas, falha no tratamento, ou indeterminado, representando o nível 1. De acordo com a pontuação obtida no nível 1, pode ser definida pelo nível 2, e diagnosticado como epilepsia refratária. Adaptado de Kwan e colaboradores (2010).

Como discutido anteriormente, a história e o tratamento da epilepsia foram relatados há cerca de cinco milênios (Bidziński, 1998). Acredita-se que o primeiro procedimento neurocirúrgico utilizado constituía-se de uma abertura no crânio, prática denominada trepanação, encontrada nos restos humanos pré-históricos do período Neolítico (Bidziński, 1998). Dado que, em 1928 a invenção do eletroencefalograma auxiliou no diagnóstico e tratamento desta doença (Bidziński, 1998), os primeiros procedimentos de lobectomia temporal para tratamento da epilepsia refratária foram reportados por Penfield e Flanigin em 1950 (Penfield e Flanigin, 1950). Apenas a partir de 1953 as consequências pós-operatórias começaram a ser discutidas, por meio da observação do comprometimento acentuado da memória de um paciente (H.M.) após ressecção do lobo temporal mesial bilateral (Scoville e Milner, 1957). Outros relatos foram observados a partir deste caso (Serafetinides e Falconer, 1962). Em 1978, 70% dos pacientes que apresentaram epilepsia do lobo temporal (ELT) e passaram pela cirurgia experimentaram cessação completa ou redução quase completa das crises. A tomografia computadorizada e o vídeo-EEG haviam sido inventados e tornaram-se disponíveis e importantes neste período. Os sistemas de monitoramento vídeo-EEG revolucionaram o entendimento das crises e sua correlação com o monitoramento pelo EEG (Rasmussen, 1980). O desenvolvimento da tecnologia de ressonância magnética (MRI), ocorrido durante as décadas de 1970 e 1980, também contribuiu para o melhor entendimento das crises (Castillo, 2014).

Apesar dos tratamentos disponíveis, necessita-se compreender melhor a doença. A nível global, aproximadamente 60 milhões de pessoas são acometidas por epilepsia (WHO, 2017). Em 70% dos casos é possível controlar as crises epilépticas utilizando os medicamentos disponíveis, porém 30% ainda apresenta epilepsia refratária (Varotto *et al.*, 2012). É importante ressaltar que pacientes que apresentam o quadro de epilepsia refratária ao tratamento sofrem de comorbidades (Trinka, 2003; Gaitatzis *et al.*, 2004), disfunção psicológica (McCagh *et al.*, 2009), estigma social (Spatt *et al.*, 2005), qualidade de vida reduzida, aumento do risco de mortalidade (Lhatoo *et al.*, 2001; Mohanraj *et al.*, 2006; Trinka *et al.*, 2013) e, em última instância, diminuição da expectativa de vida (Gaitatzis *et al.*, 2004; Gaitatzis *et al.*, 2012).

1.5 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

Há indícios de casos da ELT desde o antigo Egito, obtidos a partir de relatos sobre faraós da décima oitava dinastia (Ashrafian, 2012). É o

tipo mais comum de epilepsia refratária, correspondendo a aproximadamente 60% das epilepsias focais e pelo menos 40% de todos os casos de epilepsia (Engel, 2001). De acordo com a origem e semiologia das crises ainda pode ocorrer a subdivisão da ELT em mesial e neocortical. Sendo que a mesial (ELTM) corresponde a 60% dos casos das ELT e está relacionada com maior resistência ao tratamento farmacológico (Wiebe et al., 2001; Asadi-Pooya et al., 2017). É comumente caracterizada por esclerose do hipocampo (epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo, ELTM-EH) e crises parciais provenientes do lobo temporal (Engel, 2001; Schmidt e Löscher, 2005). As manifestações sintomáticas aparecem quando há propagação de dano irreversível no córtex entorrinal (Bartolomei, Khalil, et al., 2005), hipocampo (Mathern et al., 2002) e córtex perirrinal, que apresentam papel fundamental na disseminação de crises límbicas (Biagini et al., 2013; Centeno et al., 2014)

Desta forma, as principais características da ELT são: a presença frequente de uma "lesão precipitante inicial" precedendo o aparecimento da ELT (Mathern et al., 2002); a localização dos focos de crises no sistema límbico, particularmente no hipocampo, no córtex entorrinal e na amígdala (Bartolomei, Trébuchon, et al., 2005); um período latente, correspondente a um período sem crises após a lesão precipitante; e uma alta incidência de esclerose mesial no hipocampo, tipicamente causada por perda neuronal e gliose (Mathern et al., 1997). Essas características patológicas da ELT reduzem a possibilidade de abordagens terapêuticas bem-sucedidas, muitas vezes tornando a doença refratária. A difícil abordagem clínica e farmacológica da ELT, juntamente com a falta de entendimento do mecanismo da doença, e a taxa de sucesso limitada das abordagens cirúrgicas, aumentam a natureza incapacitante deste transtorno epiléptico específico (Di Maio, 2014).

1.6 SUMOILAÇÃO

As MPTs representam um mecanismo celular rápido para regular a função proteica em resposta aos sinais intra e extracelulares. Existem diversos tipos de MPTs desde envolvendo pequenas modificações na proteína alvo, e adição de grupos funcionais (por exemplo: fosforilação, acetilação, metilação e glicosilação) até adição de outras proteínas como a ubiquitina e proteínas semelhantes à ubiquitina (*ubiquitin-like proteins* - Ubls), como a SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) (Watts, 2013). Há aproximadamente duas décadas, a proteína SUMO foi descoberta concomitantemente e de forma independente por quatro grupos de

pesquisa (Boddy *et al.*, 1996; Matunis *et al.*, 1996; Okura *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1996). Esta proteína consiste em 97 resíduos de aminoácidos e atua como uma MPT se ligando de forma covalente aos resíduos de lisina em proteínas-alvo. Na maioria dos casos, a SUMO se conjuga à proteína através do reconhecimento da sequência consenso: ψ -K-x-D/E, na qual ψ corresponde a um resíduo hidrofóbico grande, K representa a lisina a qual a SUMO irá conjugar, x qualquer aminoácido, e D/E são resíduos ácidos de glutamato ou aspartato, respectivamente (Rodriguez *et al.*, 2001; Sampson *et al.*, 2001). Foram identificadas mais de 1000 proteínas que podem ser SUMOiladas *in vitro* (Hendriks *et al.*, 2014).

A SUMOilação é um processo de controle extremamente importante em todas as células eucarióticas, uma vez que atua regulando a função de milhares de proteínas em diversas vias (Hay 2005; Dohmen 2004). Existem cinco isoformas descritas para esta proteína. As SUMO-1-3 são expressas em todos os tecidos, já as isoformas SUMO-4 e SUMO-5 diferem por serem tecido-específicas (Bohren *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2016). Estudos prévios demonstraram que a SUMO-4 pode ser expressa no rim e no pâncreas (Wang e She, 2008; Chen *et al.*, 2014), enquanto que a SUMO-5 parece ter papel na formação e degradação dos corpúsculos nucleares de leucemia pró-mielocítica (Liang *et al.*, 2016). Ainda há necessidade de avaliar se são traduzidas em proteínas considerando que inicialmente foram descritas como pseudogenes (Liang *et al.*, 2016; Pichler *et al.*, 2017). As isoformas SUMO-2 e SUMO-3 diferem em apenas três resíduos de aminoácidos N-terminais, desta forma não há ainda um anticorpo disponível que as reconheça de forma isolada, sendo frequentemente denominadas por SUMO-2/3 (Saitoh e Hinchev, 2000; Tatham *et al.*, 2001). Estas partilham aproximadamente apenas 50% da sua sequência de aminoácidos com a SUMO-1. Como esperado, as diferentes isoformas parecem atuar de forma diferente, por exemplo, em situações de homeostase celular e fisiológica, a SUMO-1 é constitutivamente conjugada a substratos, enquanto que todas as outras isoformas apresentam-se conjugadas em situação de estresse (Saitoh e Hinchev, 2000; Wei *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2016).

A via da SUMOilação envolve uma série de etapas similares a ubiquitinação (Figura 3). As isoformas são expressas como precursores imaturos. Logo, a primeira etapa deste processo consiste na clivagem por isopeptidases para expor o domínio di-glicina (GG) C-terminal, essencial para a conjugação. Subsequentemente, em uma reação dependente de ATP, a SUMO é ativada por adenilação, permitindo que se forme uma ligação tioéster rica em energia com a cisteína catalítica da enzima

heterodimérica E1, composta pelas subunidades SAE1/SAE2 (*SUMO-activating enzyme*, subunidades 1 e 2) (Schulman e Harper, 2009). Em seguida, a SUMO é transferida para a cisteína catalítica da enzima de conjugação E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme 9*, Ubc9), resultando novamente em uma ligação tioéster (Lois e Lima, 2005; Wang *et al.*, 2010). Desta forma, a Ubc9 é capaz de conjugar a SUMO com a proteína alvo, seja de maneira dependente ou independente da enzima ligase E3. Quando transferida, a SUMO forma uma ligação isopeptídica com o resíduo de lisina da proteína alvo (Matunis *et al.*, 1996; Johnson e Blobel, 1997; Mahajan *et al.*, 1998). A desconjugação ocorre através das mesmas famílias de proteases que promovem a maturação. Todas as SUMO isopeptidases/proteases identificadas são cisteínas proteases (Nayak e Müller, 2014). Elas compartilham um mecanismo catalítico similar mas pertencem a diferentes superfamílias, as quais são diferenciadas pela conformação de seus respectivos domínios catalíticos, sendo as SENPs (*sentrin-specific proteases*) as proteases melhor caracterizadas (Bergink e Jentsch, 2009; Nayak e Müller, 2014). Na deSUMOilação ocorre a clivagem da ligação isopeptídica entre a SUMO e o seu substrato, definindo assim um equilíbrio entre as proteínas conjugadas, bem como um *pool* de SUMO livre para se ligar a outros substratos. Este processo lábil permite a resposta celular rápida e dinâmica frente a diversos estímulos (Di Bacco *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007).

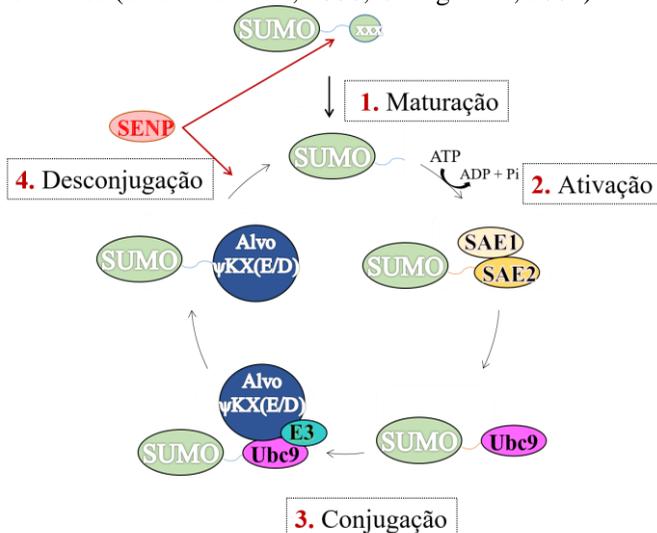


Figura 3 - Via da SUMOilação. O início da via da SUMOilação ocorre através da maturação da isoforma da SUMO pela ação das enzimas proteases SENPs.

Posteriormente, há a ativação pela enzima E1 (SAE1/SAE2), e então conjugação do substrato com a SUMO através do auxílio da enzima conjugadora E2 (Ubc9) de maneira dependente ou não da enzima de ligação E3. O processo termina com a ação das SENPs promovendo desconjugação da SUMO do substrato. Adaptado de Martin e colaboradores (2007).

A SUMOilação foi descrita primeiramente como modificadora de proteínas nucleares, por seu envolvimento direto nos processos de transcrição (Hay, 2005; Geiss-Friedlander e Melchior, 2007). Recentemente, demonstrou-se que a SUMO também afeta proteínas citoplasmáticas e de membrana, incluindo canais iônicos e receptores (Wilkinson *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2013; Silveirinha *et al.*, 2013; Coelho-Silva *et al.*, 2017). Assim, a SUMOilação cumpre papéis importantes no núcleo como também atua em diversos processos celulares, incluindo a sinalização celular, a despolarização da membrana plasmática e a transdução de sinal, fatores importantes que estão envolvidos na patologia da epilepsia (Hay, 2005; Anckar e Sistonen, 2007).

1.7 SUMOILAÇÃO E FUNÇÃO SINÁPTICA

A distribuição da maquinaria da SUMOilação durante o desenvolvimento cerebral de roedores foi relatada por três grupos distintos (Watanabe *et al.*, 2008; Loriol *et al.*, 2012; Hasegawa *et al.*, 2014). No cérebro de roedores adultos foram identificados diversos substratos para a proteína SUMO dentro de compartimentos sinápticos (Loriol *et al.*, 2012), sendo que, após a despolarização parece haver redistribuição da maquinaria da SUMOilação dentro e fora das sinapses. Esta redistribuição enzimática afeta os níveis sinápticos da SUMO (Loriol *et al.*, 2013). Desta forma, o processo da SUMOilação parece ser importante tanto para o desenvolvimento cerebral, quanto para a maturação de células neuronais e consequente função sináptica (Schorova e Martin, 2016). Há relatos sobre a SUMOilação de fatores transcricionais e proteínas envolvidas na função cerebral como na pré/pós-sinapse e plasticidade sináptica (Pichler *et al.*, 2017).

Uma família de fatores transcricionais para a qual a SUMOilação já está bem descrita é a família dos fatores de transcrição ativadores de miócito 2 (MEF2s, do inglês *myocyte-enhancer factor 2*). Esses fatores estão envolvidos em diversos processos importantes do neurodesenvolvimento incluindo diferenciação celular, morfogênese dendrítica, formação e plasticidade sináptica. Também são expressos em áreas cerebrais envolvidas com funções cognitivas como córtex,

hipocampo, amígdala e estriado (Rashid *et al.*, 2014). Mutações nos genes MEF2 têm sido implicadas em diversas patologias, incluindo epilepsia (Flavell e Greenberg, 2008; Li *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2012). Membros desta família parecem ser SUMOilados, como por exemplo o MEF2A. Quando há a troca da SUMOilação pela acetilação na lisina K403, ocorre ativação do MEF2A e inibição da diferenciação dendrítica e prejuízo sináptico (Shalizi *et al.*, 2006). Desta forma, a SUMOilação promove a repressão do MEF2A no córtex cerebral em desenvolvimento. Também foi demonstrado que a conjugação da SUMO-1 ao MEF2A participa na diferenciação cerebral de roedores (Yamada *et al.*, 2013).

A Ca^{2+} /Calmodulina-dependente de serina quinase (CASK, do inglês *calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase*) é um membro da família da guanilato quinase associada à membrana (MAGUK, do inglês *membrane-associated guanylate kinase*) e ambas são conhecidas por interagir com diversas proteínas envolvidas na espinogênese (Chao *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a CASK pode ser conjugada à SUMO-1 no resíduo de lisina K679 contribuindo para a espinogênese (Chao *et al.*, 2008).

Na pré-sinapse, diversas proteínas parecem ser moduladas pela ação da SUMO. Através da utilização de sinaptossomos, foi demonstrado que o aumento da SUMOilação por SUMO-1 reduz o influxo de Ca^{2+} e, conseqüentemente, a liberação de glutamato (Feligioni *et al.*, 2009). Diversas proteínas envolvidas no transporte de mRNAs ao longo do axônio, como a proteína La, quando SUMOiladas favorecem o transporte retrógrado (Van Niekerk *et al.*, 2007). Como também, proteínas envolvidas no complexo SNARE, por exemplo sinapsinas e syntaxinas. As sinapsinas estão envolvidas no estabelecimento, agrupamento e liberação de vesículas pré-sinápticas (Cesca *et al.*, 2010). A sinapsina Ia (SYNIA) é SUMOilada no resíduo K687 o que potencializa sua associação com vesículas sinápticas participantes no agrupamento e ancoramento destas vesículas no elemento pré-sináptico (Tang *et al.*, 2015). Já a prevenção da conjugação da SUMO-1 nas lisinas K252, 253 e 256 da syntaxina 1A, proteína importante para a reciclagem das vesículas sinápticas (Watanabe *et al.*, 2013), reduz a interação com outras proteínas do complexo SNARE e interfere com o balanço de vesículas sinápticas para endo/exocitose favorecendo o aumento da endocitose (Craig *et al.*, 2015).

A molécula de interação com a Rab3a (RIM1 α) interage direta ou indiretamente com a maioria das proteínas da zona ativa na pré-sinapse. É importante para montagem e preparo das vesículas sinápticas (Deng *et al.*, 2011), pois modula o influxo de Ca^{2+} através da regulação dos canais

de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Kaeser *et al.*, 2011; Girach *et al.*, 2013). A SUMOilação por SUMO-1 na lisina K502 da RIM1 α , parece ser crucial para liberação do neurotransmissor (Girach *et al.*, 2013). Desta forma, há indícios de que a SUMOilação exerça um importante papel na homeostase do Ca^{2+} , os quais podem ser verificados em nossa revisão no Anexo A (Coelho-Silva *et al.*, 2017). Trabalhos prévios do grupo sugerem que os canais de Ca^{2+} podem ser SUMOilados por SUMO-1 aumentando as correntes de cálcio (dados não publicados).

Os canais de K^+ dependente de voltagem formam poros seletivos para este íon que atravessam a membrana plasmática e são essenciais para a geração de potenciais de ação e o controle da excitabilidade neuronal (Dodson e Forsythe, 2004). Os canais $\text{Kv}1.1$ são abundantemente expressos no cérebro e localizados em grandes axônios onde formam tetrâmeros com subunidades $\text{Kv}1.2$. Desta forma, estes canais regulam o potencial de ação, propagação, disparo neuronal e liberação de neurotransmissores (Dodson e Forsythe, 2004). Mutações do gene que codifica o $\text{Kv}1.1$ têm sido associadas com um tipo de epilepsia em seres humanos (Zuberi *et al.*, 1999). Assim como em animais, também foi visto que mutações do receptor $\text{Kv}1.1$ levam a hiperexcitabilidade no hipocampo, epilepsia grave e morte prematura (Glasscock *et al.*, 2007). Em animais deficientes da SUMO protease SENP2, importante para a promoção da desconjugação da SUMO, ocorre hiper-SUMOilação de $\text{Kv}1.1$ e $\text{Kv}7.2/\text{Kv}7.3$ em neurônios hipocâmpais (Qi *et al.*, 2014). A família $\text{Kv}7$ parece regular a excitabilidade celular (King *et al.*, 2014). No entanto, a SUMOilação do $\text{Kv}1.1$ não afeta significativamente a atividade do canal. Notavelmente, a hiper-SUMOilação de $\text{Kv}7.2/\text{Kv}7.3$ diminui significativamente a corrente M, que é principalmente responsável pela regulação da hiperexcitabilidade neuronal (Qi *et al.*, 2014). Assim como, a SUMOilação do canal $\text{Kv}1.5$ pode inativar esses canais de K^+ em oócitos e miócitos de *Xenopus*. Já a SUMOilação de $\text{Kv}2.1$, canal que exerce função importante especialmente na determinação da excitabilidade neuronal intrínseca (Misonou *et al.*, 2005), aumenta a excitabilidade dos neurônios hipocâmpais (Rajan *et al.*, 2005; Benson *et al.*, 2007; Plant *et al.*, 2010; Plant *et al.*, 2011).

Na pós-sinapse, a subunidade GluK2 do receptor de cainato, quando conjugada à SUMO-1 na lisina K868, promove a internalização do receptor (Martin *et al.*, 2007; Konopacki *et al.*, 2011; Chamberlain *et al.*, 2012). Algumas proteínas envolvidas na plasticidade sináptica de longa duração, também parecem ser SUMOiladas (Schorova e Martin, 2016). A plasticidade sináptica de longa duração é caracterizada por gerar alterações que duram horas ou até dias e envolve dois mecanismos

principais: a depressão de longa duração (*long-term depression*, LTD) e a potencialização de longa duração (*long-term potentiation*, LTD) (Bliss e Gardner-Medwin, 1973; Zucker e Regehr, 2002). Eventos estes que estão comprometidos na epilepsia e que precisam ser melhores elucidados (Reid e Stewart, 1997; Schorova e Martin, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

A necessidade de entender a fisiopatologia da epilepsia, bem como a busca de tratamentos para indivíduos resistentes ao tratamento é de extrema importância. Com este trabalho buscamos investigar pela primeira vez processos biológicos relevantes, tais como a SUMOilação proteica, envolvidos na epileptogênese, utilizando para isto o modelo experimental da pilocarpina, o tecido cerebral de pacientes com ELTM-EH e no modelo *in silico*.

O entendimento destes e outros processos biológicos pode contribuir para a descoberta de alvos de fundamental importância para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento dos pacientes com epilepsias refratárias.

3 HIPÓTESE

A análise do perfil de SUMOilação de proteínas nas estruturas envolvidas na ELTM-EH pode proporcionar melhor compreensão acerca do surgimento das crises epiléticas, contribuindo para a descoberta de novos alvos farmacoterápicos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

- Determinar o perfil de SUMOilação global de proteínas na epilepsia do lobo temporal mesial

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar o perfil de SUMOilação de proteínas em:
 - I) Ratos submetidos ao modelo de ELTM *in vivo* (hipocampo)
 - II) Pacientes com ELTM submetidos à lobectomia temporal anterior-mesial (córtex, amígdala, hipocampo)

- Criar banco de dados através da análise *in silico* para identificar proteínas SUMOiladas em:
 - I) Cérebro de humanos saudáveis
 - II) Pacientes com ELTM
 - III) Identificar as ontologias gênicas enriquecidas em pacientes com ELTM

5 METODOLOGIA

5.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.1.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos (280-350 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram agrupados em 4 por caixa e mantidos com livre acesso à água e ração, ciclo claro/escuro (12/12 h), em sala de temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Ao realizar o manuseio dos animais foram seguidos os cuidados e normas de acordo com o “*Guide for the care and use of laboratory animals*” (NIH, 8th edition, 2011) e sob aprovação do Comitê de Ética de Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC; www.ceua.ufsc.br, protocolo PP00772). A indução do modelo experimental de pilocarpina foi realizada pelo Dr. Mark William Lopes, em colaboração com o Núcleo de Pesquisas em Neurologia Experimental e Clínica (NUPNEC) da UFSC, coordenado pelo Prof. Dr. Roger Walz, de acordo com a metodologia previamente publicada (Cavalheiro *et al.*, 1991). Para indução do modelo, uma dose intraperitoneal de pilocarpina (300 mg/kg) foi administrada em 16 animais. Com o intuito de minimizar os efeitos colinérgicos periféricos e a mortalidade, os animais foram tratados com metilnitrato de escopolamina (1 mg/kg) 30 minutos antes da administração de pilocarpina e com diazepam (5 mg/kg) 2 horas após o início das crises. Cerca de 40-80 minutos após a administração de pilocarpina, os animais apresentaram crises generalizadas. Visando reduzir o número de mortes, e aprimorar o quadro clínico geral dos animais, estes também foram alimentados e hidratados durante o período de recuperação. Apenas um animal não desenvolveu SE e a taxa de mortalidade foi de 18,75% (3 animais). Os animais sobreviventes formaram o grupo crônico, os quais desenvolveram crises espontâneas e foram eutanasiados 60 dias após a indução de SE (n = 12). Os animais controles (n = 12) receberam metilnitrato de escopolamina, salina e diazepam e foram eutanasiados 60 dias após. Inicialmente, apenas 4 animais de cada grupo foram utilizados para as análises bioquímicas relacionadas ao perfil de SUMOilação.

5.1.2 Pacientes

Os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com o Código de Ética da Associação Médica Mundial

(Declaração de Helsinki, 2013) para experimentos envolvendo seres humanos e sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH-UFSC), processo 365-FR304969. O consentimento dos pacientes foi coletado antes da submissão ao protocolo experimental.

Foram incluídos neste estudo 16 pacientes adultos com ELTM-EH fármaco-resistentes, tratados cirurgicamente entre fevereiro de 2009 a dezembro de 2017 no Centro de Epilepsia de Santa Catarina (CEPESC). Todos os pacientes apresentavam crises epiléticas com perda de consciência pelo menos uma vez ao mês, mesmo fazendo o tratamento adequado com pelo menos 2 DAEs. Os seguintes dados: histórico médico completo, semiologia das crises, exames neurológicos, avaliação neuropsicológica e psiquiátrica, análise dos picos interictal e ictal através de vídeo-EEG e os resultados de imagem de ressonância magnética consistentes com diagnóstico de ELTM-EH, foram obtidos a partir de todos os pacientes. Os critérios de exclusão foram: (1) diagnóstico de uma outra síndrome epilética diferente da ELTM-EH unilateral (2) anormalidades neurológicas focais no exame físico (3) atraso mental expresso como disfunção cognitiva considerada pela avaliação neuropsicológica e avaliação psiquiátrica e (4) picos interictais extra temporais ou generalizados identificados no EEG. As variáveis clínicas controladas foram: sexo, raça, lado da esclerose hipocampal, idade, duração da doença (em anos), idade do início da epilepsia (crises recorrentes), comorbidades psiquiátricas e qualidade de vida. Os pacientes foram considerados sob monoterapia se estivessem usando apenas uma DAE. As DAEs utilizadas foram carbamazepina, fenobarbital, difenilhidantoína, ácido valpróico, lamotrigina ou topiramato. Os pacientes que utilizavam duas ou mais DAEs (associadas ou não com benzodiazepínicos (BDZs)) foram classificados como tratamento politerápico. Os BDZs utilizados foram clobazam ou clomazepam.

5.2 ANÁLISES NEUROQUÍMICAS

5.2.1 Preparo das amostras

O perfil de SUMOilação global foi avaliado através da utilização da técnica de *Western blotting* (WB). Para isto, hipocampo (dorsal e ventral) e córtex temporal dos animais submetidos ao modelo experimental, foram dissecados a 4°C em solução contendo sacarose 110 mM, NaCl 60 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 1,25 mM, CaCl₂ 0,5 mM, Mg₂SO₄ 7 mM, glicose 5 mM e HEPES 25 mM, pH 7,4. A seguir, as

estruturas foram colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o uso. Estas amostras foram homogeneizadas mecanicamente em 400 μL de tampão de homogeneização contendo Tris 50 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na_3VO_4 2mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e cocktail inibidor de proteases.

As amostras de tecido cerebral humano (neocortex, amígdala e hipocampo) foram pesadas e homogeneizadas mecanicamente na proporção 1/4 (p/v) do tampão de homogeneização descrito acima. Importante ressaltar que, no tampão de homogeneização para preparação das amostras dos pacientes foi utilizado o inibidor de deSUMOilação, N-etilmaleimida (NEM) na concentração de 20 mM. Este procedimento não foi possível nas amostras dos animais pois já haviam sido preparadas.

Os lisados de todas as amostras foram centrifugados ($10.000 \times g$ por 10 min, a 4°C) para eliminar os restos celulares, e os sobrenadantes diluídos 1/1 (v/v) em solução de amostra contendo Tris 100 mM (pH 6,8), EDTA 4 mM, SDS 8% e fervidos a 100°C por 5 min. As proteínas foram determinadas conforme metodologia de dosagem descrita por Peterson (Peterson, 1983). Posteriormente, o tampão de diluição 25:100 (v/v), contendo glicerol 40%, Tris 100 mM (pH 6,8), azul de bromofenol e β -mercaptoetanol (concentração final 8%) foi adicionado às amostras.

5.2.2 Eletroforese e eletrotransferência

As proteínas (60 μg por poço) foram isoladas através de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio - SDS). Foi utilizado gel de separação com concentração de 12% de acrilamida para as amostras de humanos para visualização da SUMO livre (~ 10 -15 kDa), e 10% para as amostras de animais. Foi utilizado o gel de 5%. A eletroforese foi realizada com voltagem fixa de 90 V durante aproximadamente 3 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência e as proteínas transferidas para membrana de PVDF usando um sistema *semi-dry* (1,2 mA/cm²; 1,5 horas) como descrito por Bjerrum e Heegard (1988) (Figura 4).

5.2.3 Imunodeteção

Após a eletrotransferência as membranas foram bloqueadas com 5% de albumina do soro bovino (*bovine serum albumin*, BSA) diluída em solução salina tamponada, com Tris e tween 20 (*tris-buffered saline and Tween 20*, TBS-T) contendo Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05% (pH 7,5) por 1 hora. Após 3 lavagens com TBS-T, foram

incubadas *overnight* (4°C) com os anticorpos contra SUMO-1 (Cell Signalling, 1:1000) e SUMO-2/3 (Cell Signalling, 1:1000) diluídos em TBS-T e BSA 2%. Para detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora (temperatura ambiente) com anticorpo secundário anti-*rabbit* ou *mouse* (ligados a peroxidase, *horseradish peroxidase*, HRP). Posteriormente, foram colocadas em contato com o substrato de peroxidase para quimioluminescência (*enhanced chemiluminescent substrate*, ECL, *Thermo Scientific Pierce*, 1:1) por 1 minuto. A visualização das bandas de proteínas através do sistema de detecção enzimática por quimioluminescência, no qual os anticorpos conjugados com HRP catalisam a oxidação do luminol em presença do peróxido o que resulta na emissão de luz captada no fotodocumentador, foi feita utilizando o ChemiDoc™ MP. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-GAPDH (Abcam, 1:10000) como controle de carregamento do gel, ou seja, para verificar se a concentração de proteína aplicada no gel foi a mesma para todas as amostras. A SUMOilação foi determinada pela razão entre a densidade óptica (D.O.) das bandas das proteínas alvos e a D.O. do GAPDH (Tabela 1), as quais foram quantificadas utilizando o *software* Image Lab.

Para as amostras dos pacientes ELTM-EH fármaco-resistentes, foi necessário que se adotasse o uso de uma amostra denominada balizador (BLZ). O BLZ consiste de uma amostra, considerada padrão, de córtex de um paciente, a qual foi homogeneizada da mesma forma que as amostras experimentais. Normalmente utiliza-se um *pool* de amostras, porém devido a quantidade de material disponível apenas um córtex foi utilizado como BLZ. Este procedimento foi necessário devido à inexistência de um grupo controle para as respectivas áreas cerebrais analisadas, a impossibilidade de usar tecido *post-mortem* como grupo controle em um estudo de vias de sinalização celular e visando minimizar os vieses inter-dias que possam ocorrer nas etapas do WB. Portanto, o BLZ foi aplicado em todas as eletroforeses realizadas, sempre no poço que antecedia as três estruturas analisadas de cada paciente. A D.O. do BLZ obtida para cada alvo específico foi sempre considerada 100%. Sendo assim, as D.O. de todas as amostras foram determinadas e relativizadas em porcentagem do BLZ. Esta estratégia além de diminuir o erro experimental entre as análises permite fazer comparações e correlações entre os alvos analisados nas estruturas cerebrais (Lopes *et al.*, 2016).

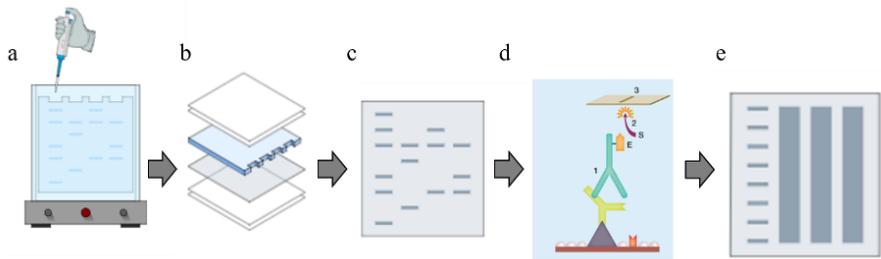


Figura 4 - Eletroforese, eletrotransferência e imunodeteção. (a) A eletroforese das amostras foi feita em gel de poli-acrilamida de concentração 12%. (b) A seguir, foi feita a transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF. As membranas (c) foram então incubadas com os anticorpos específicos para o resultado requerido para imunodeteção (d). (e) A captura das imagens foi feita através do equipamento fotodocumentador ChemiDoc™. Fonte: <https://mindthegraph.com/>

Tabela 1 - Lista de anticorpos utilizados para WB

Anticorpo	Fabricante (nº catálogo)	Diluição
Anti-mouse IgG HRP- <i>linked</i>	Abcam (ab6728)	1:5000
Anti-rabbit IgG HRP- <i>linked</i>	Cell Signalling (#7074S)	1:5000
Anti-SUMO-1	Cell Signalling (#4930)	1:1000
Anti-SUMO-2/3	Cell Signalling (#4971S)	1:1000
GAPDH	Abcam (ab8248)	1:10000

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M) e foi empregado o teste *t* de *Student* quando comparados apenas dois grupos. Também foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo post-hoc de Tukey. Em casos que os dados não são modelados pela distribuição normal, conforme verificado pelo teste de Shapiro-Wilk, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o *software* GraphPadPrism® versão 7.0 (San Diego, CA, USA).

5.4 ANÁLISE IN SILICO DO PERFIL DE SUMOILAÇÃO PROTEICA EM HUMANOS

O proteoma humano atualizado com as sequências de referências foi obtido através do banco de montagem de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information, Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 12, GRCh38.p12, 21/12/2017*). Através do Software R (<http://www.r-project.org/>), versão 3.4.3, foi possível separar as proteínas por nome, sequência (utilizando o pacote *biostrings*) e peso molecular (entre 5 a 150 kDa, utilizando os pacotes *peptides* e *tidyverse*). Foram retiradas as sequências preditivas e repetidas. Após, foi obtido o perfil de expressão proteica em tecidos humanos baseado em imunohistoquímica por microarranjo tecidual (<https://www.proteinatlas.org/>). Destes, foram selecionados apenas os tecidos do SNC relacionados à pesquisa (córtex cerebral e hipocampo). Devido à ausência de dados sobre a amígdala no *The Human Protein*, a mesma não foi incluída. Desta forma, foi feito um subconjunto da tabela completa do proteoma humano (com sequências e valores de peso molecular) com as proteínas expressas no cérebro. A partir da inserção destes dados no *software* GPS-SUMO 1.0., foram obtidas as sequências que podem ser SUMOiladas, utilizando a opção de maior stringência estatística do algoritmo.

5.5 ANÁLISE DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS QUE PODEM SER SUMOILADOS E IDENTIFICAÇÃO DE ONTOLOGIAS

A análise de expressão diferencial foi realizada utilizando dados submetidos ao banco de dados do *Gene Expression Omnibus* (GEO, #GSE25453) do NCBI. Foi possível acessar os perfis de expressão gênica de amostras de pacientes que foram diagnosticados com ELTM-EH, através do grupo de dados dos experimentos realizados por Venugopal e colaboradores (Venugopal *et al.*, 2012). Desta forma, os dados utilizados foram obtidos do experimento de microarranjo de duplo canal contendo 10 amostras com RNA de áreas com manifestações ictais e áreas que não apresentavam atividade, mas que também foram retiradas durante a lobectomia. O processamento dos dados foi realizado no ambiente do software R, com pacotes do projeto *Bioconductor*. O pacote *Linear Models for Microarray Data* (LIMMA) (Ritchie *et al.*, 2015) foi utilizado para corrigir o ruído e normalizar os valores de intensidade de expressão em \log_2 . A análise estatística utilizando Bayes Empírico foi realizada

com LIMMA para detectar os genes diferencialmente expressos (GDE). A lista de GDE identificados é baseada nos valores de corte do valor de $p < 0,05$ e *fold-change* absoluto $\geq 1,2$ ou $\leq -1,2$, possuindo rigorosidade estatística, porém considerando a importância biológica. As sequências de referência humanas dos GDE identificados foram submetidas ao *software* GPS-SUMO para prever suas capacidades de serem SUMOilados. Os valores de corte para consideração no GPS-SUMO foram os definidos como altos pelos desenvolvedores, com acurácia de 96% e especificidade de 98% (Zhao *et al.*, 2014). Desta forma, utilizando os dados obtidos foi realizada uma análise de enriquecimento de termo de ontologia (GO, *gene ontology*), utilizando a ferramenta DAVID 6.8 para encontrar classes funcionais de genes especificamente associados com a ELTM-EH e SUMOilação (Huang *et al.*, 2009). A análise estatística para identificação e a seleção de termos foi obtida pelo teste de Fisher $p < 0,1$, realizada pela própria ferramenta DAVID 6.8.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUMOILAÇÃO EM AMOSTRAS DE CÓRTEX, AMÍGDALA E HIPOCAMPO DE PACIENTES COM ELTM-EH

De acordo com os resultados obtidos através da análise do modelo animal (Apêndice A), foram preparadas amostras de hipocampo de paciente com ELTM-EH para averiguar o perfil de SUMOilação na ausência e presença do NEM (Figura 5). Também observamos diferença no perfil e na intensidade de algumas das bandas do WB tanto para SUMO-1 (Figura 5a), como para SUMO-2/3 (Figura 5b).

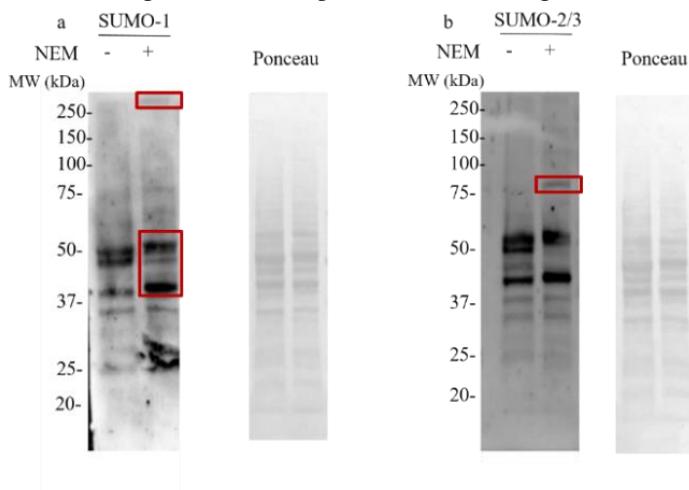


Figura 5 - Perfil de SUMOilação de proteínas em amostras de hipocampo de pacientes com ELTM-EH utilizando do inibidor NEM. Imagens representativas de WB para SUMO-1 (a) e SUMO-2/3 (b) realizados utilizando hipocampo de um paciente com ELTM-EH. n = 1.

A partir destes resultados, todas as amostras dos 16 pacientes foram preparadas na presença do NEM. As quantificações foram feitas conforme demonstrado na figura 6. O objeto da análise foi verificar diferenças no perfil de SUMOilação entre as diferentes estruturas analisadas, tanto por SUMO-1 (Tabela 2), quanto por SUMO-2/3 (Tabela 3). No entanto, não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das amostras analisadas quando comparadas as estruturas dos diferentes pacientes (Tabelas 2 e 3; Apêndice B).

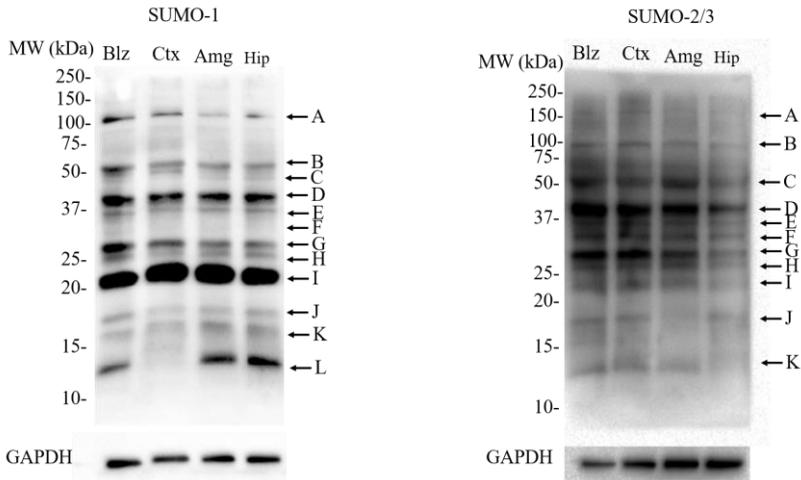


Figura 6 - Análise das membranas incubadas com SUMO-1 e SUMO-2/3 de pacientes com ELTM-EH. Imagens representativas de WB para SUMO-1 (a) e SUMO-2/3 (b) realizados utilizando amostras de indivíduos com ELTM-EH. Foi feito a análise do perfil de SUMOilação total, e por bandas. Assim como, foi feito a segregação de alto (250-25 kDa) e baixo (10 a 20 kDa) peso molecular. Blz= Blanzador; ctx= córtex; amg= amígdala; hip= hipocampo.

Tabela 2 - Perfil de SUMOilação por SUMO-1 das estruturas de pacientes ELM-EH fármacos-resistentes.

SUMO-1						
	Córtex	Amígdala	Hipocampo	Córtex x Amígdala	Córtex x Hipocampo	Amígdala x Hipocampo
	Média ± E.P.M.	Média ± E.P.M.	Média ± E.P.M.	p	p	p
Total	85,47±7,438	93,77±13,14	88,07±11,64	>0,9999	>0,9999	>0,9999
Acima de 20 kDa	83,25±7,053	89,51±11,37	82,92±11,04	>0,9999	>0,9999	>0,9999
Abaixo de 20 kDa	90,01±7,72	102,5±16,76	96,65±13,76	>0,9999	>0,9999	>0,9999
A	92,66±9,498	87,3±10,14	81,15±14,5	0,9336	0,7625	0,9231
B	87,03±9,368	96,76±15,12	84,77±14,77	>0,9999	>0,9999	>0,9999
C	84,27±8,091	112,4±17,96	77,36±11,24	0,3083	0,938	0,2001
D	91,45±13,38	130,1±30,49	93,18±13,11	0,6349	>0,9999	>0,9999
E	88,14±10,54	97,57±14,06	88,21±10,41	>0,9999	>0,9999	>0,9999
F	86,61±9,435	98,26±11,65	89,97±10,35	0,7218	>0,9999	>0,9999
G	78,24±8,999	87,85±16,29	84,85±7,407	>0,9999	0,919	>0,9999
H	87,87±9,726	98,42±15,38	94,09±12,65	>0,9999	>0,9999	>0,9999
I	92,89±11,45	71,64±8,047	68,56±9,729	0,2703	0,2703	0,8297
J	91,01±10,13	102,6±24,35	90,58±14,96	>0,9999	>0,9999	>0,9999
K	99,89±9,525	108±21,21	96,94±13,7	>0,9999	>0,9999	>0,9999
L	92,98±11,03	197±40,3	188,2±61,89	0,1108	0,3331	>0,9999

Nota: Análise estatística do perfil de SUMOilação por SUMO-1 das diferentes estruturas dos pacientes com ELM-EH expressa através do valor da densidade óptica corrigida pelo balizador. Foi analisada média ± E.P.M. das diferentes estruturas (esquerda), e obtido o p para as comparações entre as estruturas (direita). Foram analisadas as bandas tanto como um todo, obtendo o perfil total, acima de 20kDa, abaixo de kDa, e por cada banda obtida representadas pelas letras de A-L conforme indicado na membrana na figura 6a.

Tabela 3 - Perfil de SUMOilação por SUMO-2/3 das estruturas de pacientes ELTM-EH fármacos-resistentes.

SUMO-2/3						
	Córtex	Amígdala	Hipocampo	Córtex x Amígdala	Córtex x Hipocampo	Amígdala x Hipocampo
	Média ± E.P.M.	Média ± E.P.M.	Média ± E.P.M.	p	p	p
Total	84,34±6,484	91,49±11,53	78,55±10,99	>0,9999	>0,9999	>0,9999
Acima de 20 kDa	84,52±6,718	85,37±10,07	75,45±11,83	>0,9999	0,7786	>0,9999
Abaixo de 20 kDa	81,1±6,527	100,3±14,77	88,76±13,06	>0,9999	>0,9999	>0,9999
A	78,8±7,682	83,12±15,93	62,56±10,54	>0,9999	0,473	0,9823
B	82,15±6,304	78,38±9,717	62,52±8,515	>0,9999	0,1636	0,6813
C	86,12±7,046	89,25±12,01	93,39±18,99	>0,9999	>0,9999	>0,9999
D	90,3±7,087	86,46±8	87,67±19,41	>0,9999	0,8228	>0,9999
E	89,08±7,673	95,72±10,63	90,46±17,72	>0,9999	>0,9999	>0,9999
F	96,23±10,69	101,2±12,39	88,85±15,04	0,9549	0,9156	0,7772
G	93,01±10,88	81,47±9,883	72,1±13,43	0,7312	0,4188	0,8326
H	92,04±9,003	96,87±14,13	82,27±11,83	>0,9999	>0,9999	>0,9999
I	91,56±8,299	97,12±14,63	83,16±12,83	>0,9999	>0,9999	>0,9999
J	86,72±7,594	96,45±12,35	82,85±9,84	0,7703	0,965	0,6384
K	83,61±6,067	137,7±27,67	148,2±32,29	0,3014	0,5242	>0,9999

Nota: Análise estatística do perfil de SUMOilação por SUMO-2/3 das diferentes estruturas dos pacientes com ELTM-EH expressa através do valor da densidade óptica corrigida pelo balizador. Foi analisada média ± E.P.M. das diferentes estruturas (esquerda), e obtido o p para as comparações entre as estruturas (direita). Foram analisadas as bandas tanto como um todo, obtendo o perfil total, acima de 20kDa, abaixo de kDa, e por cada banda obtida representadas pelas letras de A-K conforme indicado na membrana na figura 6b.

6.2 ANÁLISE *IN SILICO*

6.2.1 Análise *in silico* do perfil de SUMOilação proteica em humanos

Para a determinação e obtenção dos dados das proteínas possivelmente SUMOiladas no tecido cerebral, foi obtido o proteoma de referência humano. Foi possível construir uma tabela utilizando as proteínas selecionadas (0-150 kDa) que poderiam ser potencialmente SUMOiladas (Apêndice C). Posteriormente estes dados podem ser correlacionados com as variáveis clínicas dos pacientes.

6.2.2 Análise de genes diferencialmente expressos que codificam proteínas que podem ser SUMOiladas e identificação de ontologias

Foi possível identificar 3619 genes de regiões com manifestações ictais (GO, #GSE25453) a partir da análise de genes diferencialmente expressos (Apêndice C). Destes, 1772 estavam *up*-regulados, sendo que 546 podem codificar proteínas que podem ser SUMOiladas, e 1847 *down*-regulados, sendo que 675 podem codificar proteínas que podem ser SUMOiladas. Para obtenção destes resultados, foram consideradas todas as lisinas das proteínas codificadas que poderiam ser modificadas pela SUMO, e diferentes isoformas destas proteínas. Estes genes foram utilizados para análise de enriquecimento de GO. Este termo refere-se a um vocabulário compartilhado, o qual representa uma ferramenta da bioinformática de termos definidos para representar propriedades específicas do produto gênico, ou seja, corresponde à representação computacional de sistemas biológicos (Schuurman e Leszczynski, 2008). As GO utilizadas foram analisadas a partir da categoria de processos biológicos. Foram selecionados os termos de GO considerados de extrema importância biológica para a patogênese e fisiopatologia da ELTM-EH, separando a busca entre genes *up*-regulados (Tabela 4; Figura 7a) e genes *down*-regulados (Tabela 5; Figura 8) envolvidos majoritariamente na regulação proteica e sinalização celular. Dentre estes, foram identificados os genes que poderiam ser SUMOilados (Figuras 7b), através do programa GPS-SUMO 1.0.

Tabela 4 - Ontologias enriquecidas para os genes *up*-regulados

Código da Ontologia	Termo da Ontologia	p-value	nº de GDE	nº de GDE SUMOIlados
GO:0006865	Transporte de aminoácido	0,00297	9	5
GO:0042493	Resposta a drogas	0,00751	35	16
GO:0003333	Transporte transmembrana de aminoácidos	0,00761	7	4
GO:0032147	Ativação da atividade de proteínas quinases	0,01435	9	6
GO:0035725	Transporte transmembrana de sódio	0,03679	11	7
GO:0060315	Regulação negativa da atividade do canal de liberação de cálcio sensível a rianodina	0,05079	4	3
GO:0048665	Especificação do destino do neurônio	0,07550	4	3
GO:0016925	SUMOilação de proteínas	0,08024	14	8
GO:0034613	Localização celular de proteínas	0,08753	7	5

Nota: A partir da seleção dos termos de ontologia para os genes diferencialmente expressos *up*-regulados nas áreas que apresentavam manifestação ictal em relação às que não apresentavam atividade das amostras de pacientes que foram retiradas durante a lobectomia, foi observado quantos genes enriqueciam esta ontologia (coluna nº de GDE), e quantos deles codificam proteínas que podem ser SUMOIladas (coluna nº de GDE SUMOIlados). $p < 0,01$.

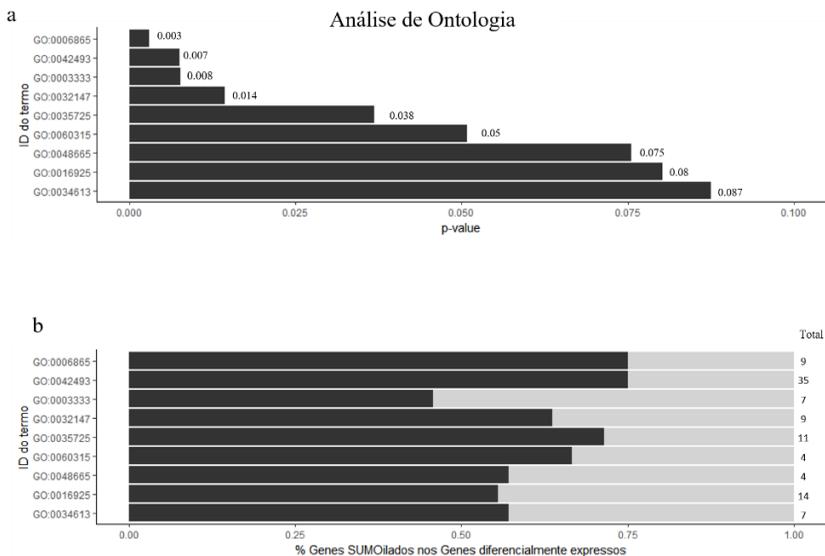


Figura 7 - Análise das ontologias enriquecidas para os genes *up*-regulados. Foram identificadas as GO enriquecidas para os genes *up*-regulados em amostras de pacientes com ELTM-EH e foram ordenadas de acordo com a maior correlação com a patologia, e envolvimento na GO (a). Destes dados, foi representada a relação entre os genes diferencialmente expressos e os genes passíveis de serem SUMOilados (barra cinza-escuro) (b).

Tabela 5 - Ontologias enriquecidas para os genes *down*-regulados

Código da Ontologia	Termo da Ontologia	P-value	n° de GDE	n° de GDE SUMOIlados
GO:0098609	Interação célula-célula	9,4E-10	56	31
GO:0046777	Autofosforilação de proteínas	1,1E-07	38	25
GO:0006886	Transporte de proteínas intracelulares	1,4E-06	44	24
GO:0000165	Cascata MAPK	2,2E-05	44	18
GO:0018105	Fosforilação de peptídiL-serina	0,001	23	15
GO:0007265	Transdução de sinal de proteína Ras	0,002	15	7
GO:0030007	Homeostase celular do ion potássio	0,002	6	6
GO:0006468	Fosforilação de proteínas	0,002	58	40
GO:0006457	Conformação de proteínas	0,003	28	12
GO:0048015	Sinalização mediada por fosfatidilinositol	0,003	19	10
GO:0035556	Transdução de sinal intracelular	0,004	51	27
GO:0006897	Endocitose	0,007	22	11
GO:0010107	Entrada de ions de potássio	0,008	8	6
GO:0016192	Transporte mediado por vesículas	0,010	23	12
GO:0034976	Resposta ao estresse do retículo endoplasmático	0,010	14	10
GO:0032880	Regulação da localização de proteínas	0,011	11	6
GO:0006464	Processo de modificação celular de proteínas	0,016	17	9
GO:0042493	Resposta à droga	0,017	38	23
GO:0006883	Homeostase celular do ion sódio	0,019	6	4
GO:0008089	Transporte axonal anterógrado	0,020	7	4
GO:0010248	Estabelecimento ou manutenção de gradiente eletroquímico transmembranar	0,020	5	4
GO:0007030	Organização do Complexo de Golgi	0,022	13	9
GO:0086009	Repolarização da membrana	0,035	4	3
GO:0090004	Regulação positiva do estabelecimento da localização da proteína à membrana plasmática	0,038	7	6
GO:0006470	Desfosforilação de proteínas	0,038	18	9
GO:0000186	Ativação da atividade da MAPKK	0,038	9	5
GO:0032483	Regulação da transdução do sinal da proteína Rab	0,039	3	3
GO:0036376	Saída dos ions sódio das células	0,047	4	4
GO:0090161	Formação do Complexo de Golgi	0,060	4	4
GO:0007269	Liberação de neurotransmissor	0,065	9	6
GO:0045666	Regulação positiva da diferenciação de neurónios	0,065	12	7
GO:0030433	Processo catabólico de proteína dependente de ubiquitina associado ao ER	0,066	10	6
GO:0018107	Fosforilação de peptídiL-reonina	0,100	7	6
GO:0030522	Via de sinalização do receptor intracelular	0,100	7	6

Nota: A partir da seleção dos termos de ontologia para os genes diferencialmente expressos *down*-regulados nas áreas que apresentavam manifestação ictal em relação às que não apresentavam atividade das amostras de pacientes que foram retiradas durante a lobectomia, foi observado quantos genes enriqueciam esta ontologia (coluna n° de GDE), e quantos deles codificam proteínas que podem ser SUMOIladas (coluna n° de GDE SUMOIlados). $p < 0,01$.

Análise de Ontologia

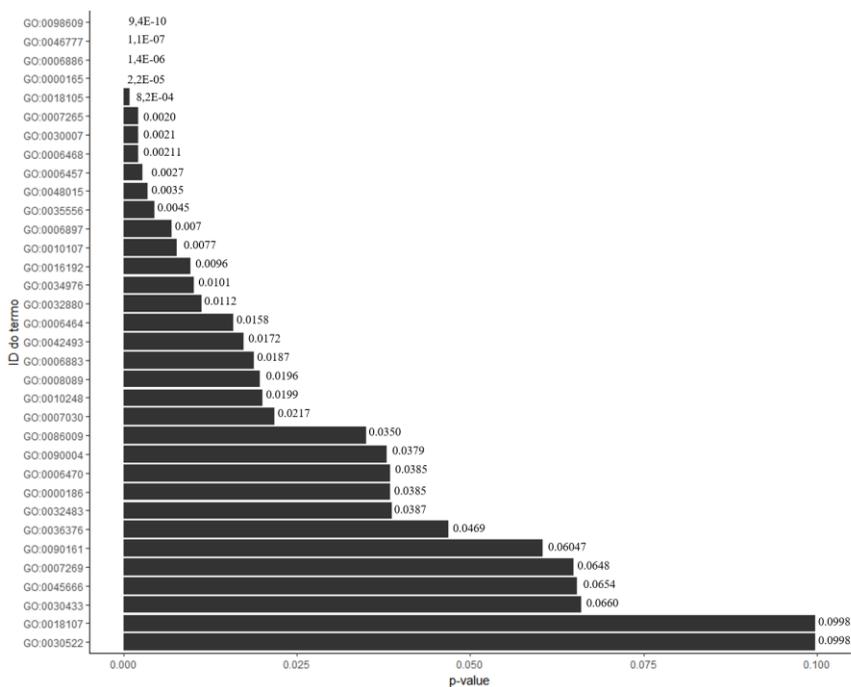


Figura 8 - Análise das ontologias enriquecidas para os genes *down*-regulados. Foram identificadas as GO enriquecidas para os genes *down*-regulados em amostras de pacientes com ELTM-EH e foram identificadas de acordo com a maior correlação com a patologia, e envolvimento na GO.

7 DISCUSSÃO

A ELTM-EH apresenta características semelhantes nos indivíduos que acomete (Thom *et al.*, 2010). A rede envolvida na geração, modulação e disseminação das crises compreende diversas áreas, além da região de origem (Norden e Blumenfeld, 2002). A partir do início da prática cirúrgica e controle das crises, foi possível determinar as regiões mesiais temporais importantes para geração destas crises (Bartolomei, Trébuchon, *et al.*, 2005). Desta forma, há interesse em determinar o papel que estas estruturas críticas desempenham. Nossos resultados parecem apoiar a hipótese que pressupõe que todas as regiões poderiam estar auxiliando na geração das crises. Por isso estariam com o mesmo padrão de atividade e conseqüentemente o mesmo perfil de SUMOilação, visto que, através da análise e comparação das estruturas removidas dos pacientes ELTM-EH fármaco-resistentes tratados cirurgicamente, não observamos diferença significativa do perfil de SUMOilação tanto de forma global, quanto analisando as bandas individualmente (Tabelas 2, 3). Através da utilização de eletrodos, alguns trabalhos demonstraram que a geração das crises pode envolver a sincronização de várias regiões límbicas (So, 1991; Spencer e Spencer, 1994; Bertram, 1997). Ainda, foi demonstrado que estas estruturas (hipocampo, córtex entorrinal, amígdala, córtex piriforme) são capazes de iniciar as crises e envolver as demais regiões em um modelo de *kindling*, o qual consiste na indução das crises epiléticas por constante estimulação elétrica de estruturas cerebrais específicas. Assim, é possível observar a capacidade de cada estrutura límbica em gerar crises e sincronização (Goddard *et al.*, 1969). Foi possível ainda, observar em modelos animais que também há excitabilidade aumentada em neurônios tanto do córtex (Chabardès *et al.*, 2005; Bonilha *et al.*, 2012) quanto da amígdala (Faber-Zuschratter *et al.*, 2009), conseqüentemente, apresentando limiares mais baixos para início de potenciais de ação. Também foi demonstrado que a remoção de todas as estruturas apresenta melhor eficácia em prevenção e diminuição do número de crises (Thom *et al.*, 2010; Thom e Bertram, 2012). Apesar dessas evidências, diversos fatores devem ser considerados ao caracterizar o perfil de SUMOilação global nas amostras estudadas. Um exemplo é a ausência de controle, que neste caso é inevitável pois não é possível comparar os resultados com tecidos *post mortem* para análise de vias de sinalização celular. Devemos também considerar a sobreposição de diversas proteínas nas bandas vistas no WB. Assim como, o número de amostras e a variabilidade entre os pacientes. Como podemos observar tanto nas tabelas 2 e 3 quanto no apêndice B, algumas amostras parecem

ter um perfil de SUMOilação diferenciado. Um exemplo seriam as bandas de 10-15 kDa que apresentam maior intensidade na amígdala e hipocampo de alguns pacientes (Figuras 6a e b), o que eleva o erro padrão da média encontrado nas bandas L e K (Tabelas 2 e 3) para SUMO-1 e SUMO-2/3, respectivamente. Estes dados poderão ser analisados posteriormente, correlacionando e agrupando estes indivíduos de acordo com as variáveis clínicas (como, por exemplo, o tempo de doença, o número de crises e o tratamento utilizado) para melhor entendimento deste tipo de variação encontrada. Em trabalho similar, foi encontrado que a administração de uma única dose de dexametasona na amígdala de pacientes com ELTM-EH causa diminuição de fosforilação do sítio GluA1-Ser831 do receptor AMPA (Lopes *et al.*, 2016). Desta forma, este tipo de análise será de extrema importância para identificação do papel da SUMOilação em pacientes com ELTM-EH. Caso seja encontrada correlação com alguma variável clínica e/ou histológica, será possível prever um possível alvo com os dados obtidos no apêndice C. Isto permitirá também que sejam utilizados modelos experimentais para moldar estes parâmetros e identificação das proteínas, e/ou vias importantes que se encontram alteradas.

Assim, ainda seria necessário caracterizar o perfil de SUMOilação de maneira independente da ausência do controle, e, de forma a eliminar a sobreposição de diversas bandas que analisamos por WB. Para isso, obtivemos através da análise do proteoma de referência humano e utilização do programa GPS-SUMO 1.0, as proteínas presentes no cérebro humano que poderiam ser SUMOiladas (Apêndice C). Conforme mencionado anteriormente, devido à ausência de dados sobre a amígdala no *The Human Protein*, a mesma não foi incluída na construção da tabela (Apêndice C). Podemos observar e confirmar que algumas proteínas e alguns fatores de transcrição como, por exemplo, MEF2 e CASK discutidos anteriormente e no artigo de revisão (Anexo A), podem ser SUMOiladas em humanos. Da mesma forma, genes que codificam canais importantes para a excitabilidade neuronal e liberação do neurotransmissor, também podem ser alvos da SUMOilação. Como o KCNMA1, que codifica *canais de potássio* de grande condutância ativados por cálcio, KCa1.1 (Li *et al.*, 2018), e que parece possuir diversas regiões que podem ser reconhecidas pela SUMO (Apêndice A). Este canal é ativado pela despolarização da membrana, aumento de Ca^{2+} ou Mg^{2+} no citosol, promovendo a saída de K^+ . Portanto, quando ativo controla os eventos excitatórios, contribuindo para a repolarização do potencial de membrana (Romanenko *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2018). Foi demonstrado que a diminuição na expressão destes canais pode

desempenhar um papel crítico na patogênese da ELTM (Ermolinsky *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2018). Desta forma, os dados obtidos demonstram proteínas que são passíveis de ser SUMOiladas em um cérebro saudável, as quais sugerimos papéis na ELTM-EH. Estes dados poderão auxiliar em futuras interpretações e a identificar os possíveis alvos, caso haja correlação clínica com a SUMOilação das estruturas analisadas, como mencionado acima.

Para melhor compreensão do papel da SUMOilação na epilepsia, foi analisada a expressão diferencial de genes de pacientes que foram diagnosticados com ELTM-EH submetidos ao banco de dados do GEO (#GSE25453) (Apêndice D). Posteriormente, foi realizada também a análise de enriquecimento de GO (Figuras 7 e 8; Tabelas 4 e 5). Foram comparadas as regiões com manifestações ictais e áreas que não apresentavam atividade, do mesmo paciente. Este tipo de controle permite que as amostras tenham sido expostas ao mesmo ambiente e, aos mesmos agentes, como fármacos (Jamali *et al.*, 2006). Além disso, diversos estudos demonstraram que há um número muito limitado de genes que apresentam expressão diferencial consistente entre duas regiões cerebrais (Sandberg *et al.*, 2000; de Chaldée *et al.*, 2003). Os termos da GO selecionados foram associados principalmente à regulação proteica. Foi possível identificar diversas GO enriquecidas já demonstradas por outros trabalhos tanto para genes *up*-regulados como processos sinápticos (Winden *et al.*, 2015; Griffin *et al.*, 2016), como para os *down*-regulados como vias de sinalização (Lukasiuk e Pitkänen, 2004) e regulação iônica (Castaldo *et al.*, 2002; Subramanian *et al.*, 2005).

Um fator importante encontrado e ainda não discutido na literatura foi o enriquecimento da SUMOilação de proteínas (GO:0016925). Entre os genes *up*-regulados desta GO, observamos as isoformas SUMO-1 e SUMO-2 e enzimas importantes no processo de SUMOilação, a E3 enzima ligase, PIAS4, e a SENP5 que pode promover a deSUMOilação mas também pode participar da maturação da SUMO (Nayak e Müller, 2014). Talvez este aumento esteja contribuindo para a desregulação das outras GO analisadas, sendo que já foi demonstrado que a hiper-SUMOilação pode levar à hiperexcitabilidade neuronal (Qi *et al.*, 2014). Podemos observar que tanto as GO enriquecidas para genes *up*-regulados (Figura 7), como *down*-regulados (Figura 8) apresentam grande quantidade de proteínas que podem ser SUMOiladas.

Em algumas GO enriquecidas de genes *down*-regulados esta proporção pode chegar a 100%, como a saída dos íons sódio das células (GO:0036376), e a homeostase do íon potássio (GO:0030007), caracterizando dois eventos fundamentais para despolarização celular e

início de potenciais de ação (McCormick e Huguenard, 1994). Além disso, dentre os genes da GO:0030007 encontramos o KCNMA1 *down-regulado* como anteriormente descrito (Ermolinsky *et al.*, 2008), e encontrado no apêndice B.

No caso da GO de resistência a drogas, encontramos enriquecimento de genes *up-* e *down-regulados*, podendo indicar tentativa de compensação biológica. Por exemplo, dentre os genes *up-regulados* temos o SLC1A2, que codifica o transportador EAAT2 que exhibe extrema importância para depuração do glutamato da fenda sináptica (Tanaka *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2011). Foi demonstrado que o EAAT2, quando SUMOilado, permanece em compartimentos intracelulares ao invés de se alojar no citoplasma para exercer sua função (Foran *et al.*, 2014).

A GO transporte de aminoácido enriquecida por genes *up-regulados* apresenta alta correlação com a patogênese da ELTM-EH, sendo altamente importante para a regulação do transporte de neurotransmissores. Um dos genes encontrados nesta GO é o SLC38A1, que codifica o transportador de glutamina, a qual atua como precursora para a síntese de glutamato, e também de GABA em neurônios gabaérgicos no ciclo glutamina-glutamato-GABA (Eid *et al.*, 2012). Esta proteína pode ser SUMOilada, porém ainda não foram descritas as consequências deste processo.

As GO enriquecidas para os genes *down-regulados* basicamente podem ser agrupados em regulação proteica, transporte iônico (Castaldo *et al.*, 2002; Subramanian *et al.*, 2005), sinalização celular (Lukasiuk e Pitkänen, 2004; Salman *et al.*, 2017) e função astrocitária (Coulter e Steinhäuser, 2015; Dossi *et al.*, 2018), todas caracterizadas na ELTM-EH. Porém, o papel da SUMOilação nestes genes, precisa ser melhor elucidado apesar de estar tão presente.

Desta forma estes, dados iniciam uma discussão que deve ser experimental e amplamente explorada.

8 CONCLUSÃO

A SUMOilação parece exercer papel na patogênese e fisiopatologia da epilepsia. A caracterização da análise tanto no modelo experimental quanto em pacientes se faz necessária, e contribuiria para melhor entendimento da ELTM-EH. É de fundamental importância realizar outros experimentos para demonstrar de fato que esta MPT exerce papel na epilepsia, e caracterização desta função. A correlação dos dados obtidos e construídos com as variáveis clínicas dos pacientes com ELTM-EH seria de extrema importância e inovação. Desta forma, poderia contribuir com o entendimento desta doença e poderia servir de possível tratamento. Sendo que, para uma patologia multifatorial se faz interessante analisar um processo que pode modular diversas vias, ao invés de apenas alvos restritos.

9 PERSPECTIVAS

Pretendemos explorar o modelo *in vivo* para determinação do perfil de SUMOilação, pois devido a limitações técnicas não foi possível defini-lo neste modelo. Quanto aos resultados obtidos a partir do *Western blotting* dos pacientes com ELTM, faz-se interessante correlacioná-los com os dados das variáveis clínicas. Assim como, identificar quais são as proteínas com perfil de SUMOilação alterado por proteômica. Os dados *in silico* serão importantes para tentar identificar possíveis alvos da SUMOilação em modelos de ELTM.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. et al. Epilepsy in the Renaissance: a survey of remedies from 16th and 17th century German herbals. **J Ethnopharmacol**, v. 143, n. 1, p. 1-13, Aug 2012. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22710294> >.
- ANCKAR, J.; SISTONEN, L. SUMO: getting it on. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 6, p. 1409-13, Dec 2007. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031233> >.
- ARMIJO, J. A. et al. Ion channels and epilepsy. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 15, p. 1975-2003, 2005. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15974971> >.
- ASADI-POOYA, A. A. et al. Prevalence and Incidence of Drug-Resistant Mesial Temporal Lobe Epilepsy in the United States. **World Neurosurg**, v. 99, p. 662-666, Mar 2017. ISSN 1878-8769. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28034810> >.
- ASHRAFIAN, H. Familial epilepsy in the pharaohs of ancient Egypt's eighteenth dynasty. **Epilepsy Behav**, v. 25, n. 1, p. 23-31, Sep 2012. ISSN 1525-5069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22980077> >.
- AZEVEDO, F. A. et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. **J Comp Neurol**, v. 513, n. 5, p. 532-41, Apr 2009. ISSN 1096-9861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19226510> >.
- BARTOLOMEI, F. et al. Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. **Epilepsia**, v. 46, n. 5, p. 677-87, May 2005. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857433> >.
- _____. Acute alteration of emotional behaviour in epileptic seizures is related to transient desynchrony in emotion-regulation networks. **Clin Neurophysiol**, v. 116, n. 10, p. 2473-9, Oct 2005. ISSN 1388-2457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125458> >.

BENSON, M. D. et al. SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 6, p. 1805-10, Feb 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17261810> >.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-85, Apr 2010. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20196795> >.

BERGINK, S.; JENTSCH, S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 461-7, Mar 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325626> >.

BERTRAM, E. H. Functional anatomy of spontaneous seizures in a rat model of limbic epilepsy. **Epilepsia**, v. 38, n. 1, p. 95-105, Jan 1997. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9024190> >.

BEYDOUN, A. et al. Lacosamide: pharmacology, mechanisms of action and pooled efficacy and safety data in partial-onset seizures. **Expert Rev Neurother**, v. 9, n. 1, p. 33-42, Jan 2009. ISSN 1744-8360. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19102666> >.

BIAGINI, G. et al. Perirhinal cortex and temporal lobe epilepsy. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 130, Aug 2013. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009554> >.

BIDZIŃSKI, J. History of the surgical treatment of epilepsy. **Neurol Neurochir Pol**, v. 32 Suppl 2, p. 13-23, 1998. ISSN 0028-3843. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9757429> >.

BLISS, T. V.; GARDNER-MEDWIN, A. R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol**, v. 232, n. 2, p. 357-74, Jul 1973. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4727085> >.

BLUME, W. T. et al. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 9, p. 1212-8, Sep 2001. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11580774> >.

BODDY, M. N. et al. PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. **Oncogene**, v. 13, n. 5, p. 971-82, Sep 1996. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8806687> >.

BOHREN, K. M. et al. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. **J Biol Chem**, v. 279, n. 26, p. 27233-8, Jun 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15123604> >.

BONILHA, L. et al. Medial temporal lobe epilepsy is associated with neuronal fibre loss and paradoxical increase in structural connectivity of limbic structures. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 83, n. 9, p. 903-9, Sep 2012. ISSN 1468-330X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22764263> >.

BOWIE, D. Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 7, n. 2, p. 129-43, Apr 2008. ISSN 1871-5273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537642> >.

BRODIE, M. J. et al. Rufinamide for the adjunctive treatment of partial seizures in adults and adolescents: a randomized placebo-controlled trial. **Epilepsia**, v. 50, n. 8, p. 1899-909, Aug 2009. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19490053> >.

CASTALDO, P. et al. Benign familial neonatal convulsions caused by altered gating of KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. **J Neurosci**, v. 22, n. 2, p. RC199, Jan 2002. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11784811> >.

CASTILLO, M. History and evolution of brain tumor imaging: insights through radiology. **Radiology**, v. 273, n. 2 Suppl, p. S111-25, Nov 2014. ISSN 1527-1315. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25340432> >.

CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **Ital J Neurol Sci**, v. 16, n. 1-2, p. 33-7, 1995 Feb-Mar 1995. ISSN 0392-0461. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642349> >.

CAVALHEIRO, E. A. et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, n. 6, p. 778-82, 1991 Nov-Dec 1991. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1743148> >.

CENTENO, M. et al. Structural changes in the temporal lobe and piriform cortex in frontal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 108, n. 5, p. 978-81, Jul 2014. ISSN 1872-6844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24726451> >.

CESCA, F. et al. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. **Prog Neurobiol**, v. 91, n. 4, p. 313-48, Aug 2010. ISSN 1873-5118. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20438797> >.

CHABARDÈS, S. et al. The temporopolar cortex plays a pivotal role in temporal lobe seizures. **Brain**, v. 128, n. Pt 8, p. 1818-31, Aug 2005. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857932> >.

CHAMBERLAIN, S. E. et al. SUMOylation and phosphorylation of GluK2 regulate kainate receptor trafficking and synaptic plasticity. **Nat Neurosci**, v. 15, n. 6, p. 845-52, Jun 2012. ISSN 1546-1726. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22522402> >.

CHAO, H. W. et al. SUMOylation of the MAGUK protein CASK regulates dendritic spinogenesis. **J Cell Biol**, v. 182, n. 1, p. 141-55, Jul 2008. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606847> >.

CHAUDHARY, U. J.; DUNCAN, J. S.; LEMIEUX, L. A dialogue with historical concepts of epilepsy from the Babylonians to Hughlings Jackson: persistent beliefs. **Epilepsy Behav**, v. 21, n. 2, p. 109-14, Jun 2011. ISSN 1525-5069. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21550316> >.

CHEN, S. et al. Inflammatory factor-specific sumoylation regulates NF- κ B signalling in glomerular cells from diabetic rats. **Inflamm Res**, v. 63, n. 1, p. 23-31, Jan 2014. ISSN 1420-908X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24173240> >.

CHENG, J. et al. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1 α during hypoxia. **Cell**, v. 131, n. 3, p. 584-95, Nov 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981124> >.

CHUNG, C.; RAINGO, J. Vesicle dynamics: how synaptic proteins regulate different modes of neurotransmission. **J Neurochem**, v. 126, n. 2, p. 146-54, Jul 2013. ISSN 1471-4159. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23517499> >.

CITRI, A.; MALENKA, R. C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 18-41, Jan 2008. ISSN 0893-133X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17728696> >.

CLIFFORD, D. B. et al. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 953-68, Dec 1987. ISSN 0306-4522. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3437996> >.

COBB, S. R. et al. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. **Nature**, v. 378, n. 6552, p. 75-8, Nov 1995. ISSN 0028-0836. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7477292> >.

COULTER, D. A.; STEINHÄUSER, C. Role of astrocytes in epilepsy. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 3, p. a022434, Mar 2015. ISSN 2157-1422. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25732035> >.

CRAIG, T. J. et al. SUMOylation of Syntaxin1A regulates presynaptic endocytosis. **Sci Rep**, v. 5, p. 17669, Dec 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635000> >.

CURIA, G. et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci Methods**, v. 172, n. 2, p. 143-57, Jul 2008. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550176> >.

DE CHALDÉE, M. et al. Quantitative assessment of transcriptome differences between brain territories. **Genome Res**, v. 13, n. 7, p. 1646-53, Jul 2003. ISSN 1088-9051. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12840043> >.

DELGADO-ESCUETA, A. V. et al. Status epilepticus: summary. **Adv Neurol**, v. 34, p. 537-41, 1983. ISSN 0091-3952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6829359> >.

DENG, L. et al. RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13. **Neuron**, v. 69, n. 2, p. 317-31, Jan 2011. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21262469> >.

DERIBE, Y. L.; PAWSON, T.; DIKIC, I. Post-translational modifications in signal integration. **Nat Struct Mol Biol**, v. 17, n. 6, p. 666-72, Jun 2010. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495563> >.

DI BACCO, A. et al. The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 12, p. 4489-98, Jun 2006. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16738315> >.

DI MAIO, R. Neuronal mechanisms of epileptogenesis. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 29, 2014. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24600345> >.

DIBUÉ-ADJEI, M. et al. Cav2.3 (R-Type) Calcium Channels are Critical for Mediating Anticonvulsive and Neuroprotective Properties of Lamotrigine In Vivo. **Cell Physiol Biochem**, v. 44, n. 3, p. 935-947, Nov 2017. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29176325> >.

DODSON, P. D.; FORSYTHE, I. D. Presynaptic K⁺ channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. **Trends Neurosci**, v. 27, n. 4, p. 210-7, Apr 2004. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15046880> >.

DOSSI, E.; VASILE, F.; ROUACH, N. Human astrocytes in the diseased brain. **Brain Res Bull**, v. 136, p. 139-156, Jan 2018. ISSN 1873-2747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28212850> >.

DUAN, G.; WALTHER, D. The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. **PLoS Comput Biol**, v. 11, n. 2, p. e1004049, Feb 2015. ISSN 1553-7358. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25692714> >.

ECCLES, J. C. Developing concepts of the synapses. **J Neurosci**, v. 10, n. 12, p. 3769-81, Dec 1990. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1980129> >.

EID, T. et al. Roles of glutamine synthetase inhibition in epilepsy. **Neurochem Res**, v. 37, n. 11, p. 2339-50, Nov 2012. ISSN 1573-6903. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22488332> >.

ELORANTA, J. J.; HURST, H. C. Transcription factor AP-2 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and is sumoylated in vivo. **J Biol Chem**, v. 277, n. 34, p. 30798-804, Aug 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072434> >.

ENGEL, J. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? **Neuroscientist**, v. 7, n. 4, p. 340-52, Aug 2001. ISSN 1073-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11488399> >.

_____. Report of the ILAE classification core group. **Epilepsia**, v. 47, n. 9, p. 1558-68, Sep 2006. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16981873> >.

ERMOLINSKY, B. et al. Deficit of Kcnma1 mRNA expression in the dentate gyrus of epileptic rats. **Neuroreport**, v. 19, n. 13, p. 1291-4, Aug 2008. ISSN 1473-558X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18695509> >.

FABER-ZUSCHRATTER, H. et al. Ultrastructural and functional characterization of satellitosis in the human lateral amygdala associated with Ammon's horn sclerosis. **Acta Neuropathol**, v. 117, n. 5, p. 545-55, May 2009. ISSN 1432-0533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19247679> >.

FELIGIONI, M.; NISHIMUNE, A.; HENLEY, J. M. Protein SUMOylation modulates calcium influx and glutamate release from presynaptic terminals. **Eur J Neurosci**, v. 29, n. 7, p. 1348-56, Apr 2009. ISSN 1460-9568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344328> >.

FISHER, R. S. The New Classification of Seizures by the International League Against Epilepsy 2017. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 17, n. 6, p. 48, Jun 2017. ISSN 1534-6293. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28425015> >.

FISHER, R. S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-82, Apr 2014. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24730690> >.

_____. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522-530, Apr 2017. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28276060> >.

_____. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-2, Apr 2005. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15816939> >.

_____. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v. 22, n. 4, p. 489-501, Aug 1981. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6790275> >.

FOGARTY, M. J. et al. Glycinergic Neurotransmission: A Potent Regulator of Embryonic Motor Neuron Dendritic Morphology and Synaptic Plasticity. **J Neurosci**, v. 36, n. 1, p. 80-7, Jan 2016. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26740651> >.

FORAN, E. et al. Sumoylation of the astroglial glutamate transporter EAAT2 governs its intracellular compartmentalization. **Glia**, v. 62, n. 8, p. 1241-53, Aug 2014. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24753081> >.

FLAVELL, S. W.; GREENBERG, M. E. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. **Annu Rev Neurosci**, v. 31, p. 563-90, 2008. ISSN 0147-006X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18558867> >.

GAITATZIS, A. et al. Life expectancy in people with newly diagnosed epilepsy. **Brain**, v. 127, n. Pt 11, p. 2427-32, Nov 2004. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15371287> >.

GAITATZIS, A.; SISODIYA, S. M.; SANDER, J. W. The somatic comorbidity of epilepsy: a weighty but often unrecognized burden. **Epilepsia**, v. 53, n. 8, p. 1282-93, Aug 2012. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22691064> >.

GEISS-FRIEDLANDER, R.; MELCHIOR, F. Concepts in sumoylation: a decade on. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 947-56, Dec 2007. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000527> >.

GIRACH, F. et al. RIM1 α SUMOylation is required for fast synaptic vesicle exocytosis. **Cell Rep**, v. 5, n. 5, p. 1294-301, Dec 2013. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24290762> >.

GLASSCOCK, E. et al. Masking epilepsy by combining two epilepsy genes. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 12, p. 1554-8, Dec 2007. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982453> >.

GODDARD, G. V.; MCINTYRE, D. C.; LEECH, C. K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Exp Neurol**, v. 25, n. 3, p. 295-330, Nov 1969. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4981856> >.

GRIFFIN, N. G. et al. Differential gene expression in dentate granule cells in mesial temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis. **Epilepsia**, v. 57, n. 3, p. 376-85, Mar 2016. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26799155> >.

GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Contribution of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Res**, v. 12, n. 2, p. 141-9, Jul 1992. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1327744> >.

GROSS, R. A. A brief history of epilepsy and its therapy in the Western Hemisphere. **Epilepsy Res**, v. 12, n. 2, p. 65-74, Jul 1992. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1396542> >.

GUO, D. et al. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. **Nat Genet**, v. 36, n. 8, p. 837-41, Aug 2004. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247916> >.

HAMILTON, S. E. et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 24, p. 13311-6, Nov 1997. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371842> >.

HASEGAWA, Y. et al. Spatiotemporal distribution of SUMOylation components during mouse brain development. **J Comp Neurol**, v. 522, n. 13, p. 3020-36, Sep 2014. ISSN 1096-9861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639124> >.

HAY, R. T. SUMO: a history of modification. **Mol Cell**, v. 18, n. 1, p. 1-12, Apr 2005. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15808504> >.

HECKER, C. M. et al. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. **J Biol Chem**, v. 281, n. 23, p. 16117-27, Jun 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16524884> >.

HENDRIKS, I. A. et al. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. **Nat Struct Mol Biol**, v. 21, n. 10, p. 927-36, Oct 2014. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25218447> >.

HENLEY, J. M.; CRAIG, T. J.; WILKINSON, K. A. Neuronal SUMOylation: mechanisms, physiology, and roles in neuronal dysfunction. **Physiol Rev**, v. 94, n. 4, p. 1249-85, Oct 2014. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287864> >.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 425-79, 1998. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759494> >.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131956> >.

JACOBY, A. et al. Quality of life outcomes of immediate or delayed treatment of early epilepsy and single seizures. **Neurology**, v. 68, n. 15, p. 1188-96, Apr 2007. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17420402> >.

JAMALI, S. et al. Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. **Brain**, v. 129, n. Pt 3, p. 625-41, Mar 2006. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16399808> >.

JOHNSON, E. S.; BLOBEL, G. Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. **J Biol Chem**, v. 272, n. 43, p. 26799-802, Oct 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9341106> >.

KAESER, P. S. et al. RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. **Cell**, v. 144, n. 2, p. 282-95, Jan 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21241895> >.

KANAKOUSAKI, K.; GIBSON, M. C. A differential requirement for SUMOylation in proliferating and non-proliferating cells during Drosophila development. **Development**, v. 139, n. 15, p. 2751-62, Aug 2012. ISSN 1477-9129. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745316> >.

KATZ, B.; MILEDI, R. A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. **J Physiol**, v. 192, n. 2, p. 407-36, Sep 1967. ISSN 0022-3751. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4383089> >.

KEEZER, M. R.; SISODIYA, S. M.; SANDER, J. W. Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives. **Lancet Neurol**, v. 15, n. 1, p. 106-15, Jan 2016. ISSN 1474-4465. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26549780> >.

KHAN, G. M. et al. Anticonvulsant effect and neurotransmitter modulation of focal and systemic 2-chloroadenosine against the development of pilocarpine-induced seizures. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 12, p. 2418-32, Sep 2000. ISSN 0028-3908. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974326> >.

KING, C. H. et al. Kv7.2 regulates the function of peripheral sensory neurons. **J Comp Neurol**, v. 522, n. 14, p. 3262-80, Oct 2014. ISSN 1096-9861. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24687876> >.

KIM, K. et al. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. **J Cell Physiol**, v. 226, n. 10, p. 2484-93, Oct 2011. ISSN 1097-4652. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21792905> >.

KNORRE, D. G.; KUDRYASHOVA, N. V.; GODOVIKOVA, T. S. Chemical and functional aspects of posttranslational modification of

proteins. **Acta Naturae**, v. 1, n. 3, p. 29-51, Oct 2009. ISSN 2075-8251. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22649613> >.

KONOPACKI, F. A. et al. Agonist-induced PKC phosphorylation regulates GluK2 SUMOylation and kainate receptor endocytosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 49, p. 19772-7, Dec 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22089239> >.

KORINTHENBERG, R. et al. Pharmacology, efficacy, and tolerability of potassium bromide in childhood epilepsy. **J Child Neurol**, v. 22, n. 4, p. 414-8, Apr 2007. ISSN 0883-0738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17621520> >.

KRALL, R. L. et al. Antiepileptic drug development: I. History and a program for progress. **Epilepsia**, v. 19, n. 4, p. 393-408, Aug 1978. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/359324> >.

KWAN, P. et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, v. 51, n. 6, p. 1069-77, Jun 2010. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19889013> >.

KWAN, P.; BRODIE, M. J. Refractory epilepsy: mechanisms and solutions. **Expert Rev Neurother**, v. 6, n. 3, p. 397-406, Mar 2006. ISSN 1744-8360. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533143> >.

_____. Emerging drugs for epilepsy. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 12, n. 3, p. 407-22, Sep 2007. ISSN 1744-7623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17874969> >.

LANCASTER, E. et al. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. **Lancet Neurol**, v. 9, n. 1, p. 67-76, Jan 2010. ISSN 1474-4465. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19962348> >.

LHATOO, S. D. et al. Mortality in epilepsy in the first 11 to 14 years after diagnosis: multivariate analysis of a long-term, prospective,

population-based cohort. **Ann Neurol**, v. 49, n. 3, p. 336-44, Mar 2001. ISSN 0364-5134. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11261508> >.

LI, H. et al. Transcription factor MEF2C influences neural stem/progenitor cell differentiation and maturation in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 27, p. 9397-402, Jul 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599437> >.

LIANG, Y. C. et al. SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. **Sci Rep**, v. 6, p. 26509, May 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27211601> >.

LOIS, L. M.; LIMA, C. D. Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. **EMBO J**, v. 24, n. 3, p. 439-51, Feb 2005. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15660128> >.

LONGRIGG, J. Epilepsy in ancient Greek medicine--the vital step. **Seizure**, v. 9, n. 1, p. 12-21, Jan 2000. ISSN 1059-1311. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10667958> >.

LOPES, M. W. et al. A single high dose of dexamethasone affects the phosphorylation state of glutamate AMPA receptors in the human limbic system. **Transl Psychiatry**, v. 6, n. 12, p. e986, 12 2016. ISSN 2158-3188. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27959333> >.

LORIOLO, C. et al. Activity-dependent regulation of the sumoylation machinery in rat hippocampal neurons. **Biol Cell**, v. 105, n. 1, p. 30-45, Jan 2013. ISSN 1768-322X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066795> >.

_____. Developmental regulation and spatiotemporal redistribution of the sumoylation machinery in the rat central nervous system. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33757, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22438991> >.

LUKASIUK, K.; PITKÄNEN, A. Large-scale analysis of gene expression in epilepsy research: is synthesis already possible? **Neurochem Res**, v. 29, n. 6, p. 1169-78, Jun 2004. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15176474> >.

LUO, J. et al. Receptor trafficking and the regulation of synaptic plasticity by SUMO. **Neuromolecular Med**, v. 15, n. 4, p. 692-706, Dec 2013. ISSN 1559-1174. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23934328> >.

MAHAJAN, R.; GERACE, L.; MELCHIOR, F. Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. **J Cell Biol**, v. 140, n. 2, p. 259-70, Jan 1998. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9442102> >.

MARTIN, D. J. et al. Gabapentin-mediated inhibition of voltage-activated Ca²⁺ channel currents in cultured sensory neurones is dependent on culture conditions and channel subunit expression. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 3, p. 353-66, Mar 2002. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897114> >.

MATHERN, G. W. et al. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 237-51, 2002. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12143344> >.

_____. Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 56, n. 2, p. 199-212, Feb 1997. ISSN 0022-3069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9034374> >.

MATUNIS, M. J.; COUTAVAS, E.; BLOBEL, G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. **J Cell Biol**, v. 135, n. 6 Pt 1, p. 1457-70, Dec 1996. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978815> >.

MCCAGH, J.; FISK, J. E.; BAKER, G. A. Epilepsy, psychosocial and cognitive functioning. **Epilepsy Res**, v. 86, n. 1, p. 1-14, Sep 2009. ISSN 1872-6844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19616921> >.

MCKNIGHT, K. et al. Serum antibodies in epilepsy and seizure-associated disorders. **Neurology**, v. 65, n. 11, p. 1730-6, Dec 2005. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16344514> >.

MEISLER, M. H. et al. Identification of epilepsy genes in human and mouse. **Annu Rev Genet**, v. 35, p. 567-88, 2001. ISSN 0066-4197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700294> >.

MELDRUM, B. S.; ROGAWSKI, M. A. Molecular targets for antiepileptic drug development. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 18-61, Jan 2007. ISSN 1933-7213. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17199015> >.

MISONOU, H.; MOHAPATRA, D. P.; TRIMMER, J. S. Kv2.1: a voltage-gated k⁺ channel critical to dynamic control of neuronal excitability. **Neurotoxicology**, v. 26, n. 5, p. 743-52, Oct 2005. ISSN 0161-813X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15950285> >.

MOHANRAJ, R. et al. Mortality in adults with newly diagnosed and chronic epilepsy: a retrospective comparative study. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 6, p. 481-7, Jun 2006. ISSN 1474-4422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713919> >.

NAYAK, A.; MÜLLER, S. SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond. **Genome Biol**, v. 15, n. 7, p. 422, Jul 2014. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25315341> >.

NGUGI, A. K. et al. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. **Epilepsia**, v. 51, n. 5, p. 883-90, May 2010. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067507> >.

NIEHUSMANN, P. et al. Diagnostic value of N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in women with new-onset epilepsy. **Arch Neurol**, v. 66, n. 4, p. 458-64, Apr 2009. ISSN 1538-3687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19364930> >.

OKURA, T. et al. Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. **J Immunol**, v. 157, n. 10, p. 4277-81, Nov 1996. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8906799> >.

PENFIELD, W.; FLANIGIN, H. Surgical therapy of temporal lobe seizures. **AMA Arch Neurol Psychiatry**, v. 64, n. 4, p. 491-500, Oct 1950. ISSN 0096-6886. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14770593> >.

PETERSON, G. L. Determination of total protein. **Methods Enzymol**, v. 91, p. 95-119, 1983. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6855607> >.

PICHLER, A. et al. SUMO conjugation - a mechanistic view. **Biomol Concepts**, v. 8, n. 1, p. 13-36, Mar 2017. ISSN 1868-503X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28284030> >.

PINHEIRO, P. S.; MULLE, C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 6, p. 423-36, Jun 2008. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18464791> >.

PITKÄNEN, A. et al. Progression of neuronal damage after status epilepticus and during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 67-83, 2002. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12143371> >.

PLANT, L. D. et al. One SUMO is sufficient to silence the dimeric potassium channel K2P1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 23, p. 10743-8, Jun 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498050> >.

_____. SUMO modification of cell surface Kv2.1 potassium channels regulates the activity of rat hippocampal neurons. **J Gen Physiol**, v.

137, n. 5, p. 441-54, May 2011. ISSN 1540-7748. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518833> >.

PRABAKARAN, S. et al. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 4, n. 6, p. 565-83, 2012 Nov-Dec 2012. ISSN 1939-005X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22899623> >.

PRIEL, M. R.; ALBUQUERQUE, E. X. Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture. **Epilepsia**, v. 43 Suppl 5, p. 40-6, 2002. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121294> >.

QI, Y. et al. Hyper-SUMOylation of the Kv7 potassium channel diminishes the M-current leading to seizures and sudden death. **Neuron**, v. 83, n. 5, p. 1159-71, Sep 2014. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189211> >.

RAJAN, S. et al. Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1. **Cell**, v. 121, n. 1, p. 37-47, Apr 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15820677> >.

RASHID, A. J.; COLE, C. J.; JOSSELYN, S. A. Emerging roles for MEF2 transcription factors in memory. **Genes Brain Behav**, v. 13, n. 1, p. 118-25, Jan 2014. ISSN 1601-183X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23790063> >.

RASMUSSEN, T. Surgical aspects of temporal lobe epilepsy. Results and problems. **Acta Neurochir Suppl (Wien)**, v. 30, p. 13-24, 1980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7008515> >.

REID, I. C.; STEWART, C. A. Seizures, memory and synaptic plasticity. **Seizure**, v. 6, n. 5, p. 351-9, Oct 1997. ISSN 1059-1311. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9663798> >.

RITCHIE, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. 7, p. e47, Apr 2015. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25605792> >.

RIZZOLI, S. O.; BETZ, W. J. Synaptic vesicle pools. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 1, p. 57-69, Jan 2005. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611727> >.

RODRIGUEZ, M. S.; DARGEMONT, C.; HAY, R. T. SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. **J Biol Chem**, v. 276, n. 16, p. 12654-9, Apr 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124955> >.

ROGAWSKI, M. A.; LÖSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 7, p. 553-64, Jul 2004. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208697> >.

SAITOH, H.; HINCHEY, J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. **J Biol Chem**, v. 275, n. 9, p. 6252-8, Mar 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692421> >.

SALAMI, P. et al. Dynamics of interictal spikes and high-frequency oscillations during epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 67, p. 97-106, Jul 2014. ISSN 1095-953X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24686305> >.

SALMAN, M. M. et al. Transcriptome analysis suggests a role for the differential expression of cerebral aquaporins and the MAPK signalling pathway in human temporal lobe epilepsy. **Eur J Neurosci**, v. 46, n. 5, p. 2121-2132, Sep 2017. ISSN 1460-9568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28715131> >.

SAMPSON, D. A.; WANG, M.; MATUNIS, M. J. The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. **J Biol Chem**, v. 276, n. 24, p. 21664-9, Jun 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259410> >.

SANDBERG, R. et al. Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 20, p. 11038-43, Sep 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005875> >.

SANDERSON, J. L.; DELL'ACQUA, M. L. AKAP signaling complexes in regulation of excitatory synaptic plasticity. **Neuroscientist**, v. 17, n. 3, p. 321-36, Jun 2011. ISSN 1089-4098. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21498812> >.

SCHARFMAN, H. E. The neurobiology of epilepsy. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 7, n. 4, p. 348-54, Jul 2007. ISSN 1528-4042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618543> >.

SCHMIDT, D.; LÖSCHER, W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. **Epilepsia**, v. 46, n. 6, p. 858-77, Jun 2005. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15946327> >.

SCHOROVA, L.; MARTIN, S. Sumoylation in Synaptic Function and Dysfunction. **Front Synaptic Neurosci**, v. 8, p. 9, 2016. ISSN 1663-3563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27199730> >.

SCHULMAN, B. A.; HARPER, J. W. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 319-31, May 2009. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19352404> >.

SCHUURMAN, N.; LESZCZYNSKI, A. Ontologies for bioinformatics. **Bioinform Biol Insights**, v. 2, p. 187-200, Mar 2008. ISSN 1177-9322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812775> >.

SCORZA, F. A. et al. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **An Acad Bras Cienc**, v. 81, n. 3, p. 345-65, Sep 2009. ISSN 1678-2690. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722008> >.

SCOTT, R. C. What are the effects of prolonged seizures in the brain? **Epileptic Disord**, v. 16 Spec No 1, p. S6-11, Oct 2014. ISSN 1950-6945. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25323416> >.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 20, n. 1, p.

11-21, Feb 1957. ISSN 0022-3050. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13406589> >.

SERAFETINIDES, E. A.; FALCONER, M. A. Some observations on memory impairment after temporal lobectomy for epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 25, p. 251-5, Aug 1962. ISSN 0022-3050. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13910728> >.

SHALIZI, A. et al. A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. **Science**, v. 311, n. 5763, p. 1012-7, Feb 2006. ISSN 1095-9203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16484498> >.

SHAPIRO, L. A.; WANG, L.; RIBAK, C. E. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. **Epilepsia**, v. 49 Suppl 2, p. 33-41, 2008. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226170> >.

SHEN, Z. et al. UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. **Genomics**, v. 36, n. 2, p. 271-9, Sep 1996. ISSN 0888-7543. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8812453> >.

SIEVEKING, E. H. Analysis of Fifty-two Cases of Epilepsy observed by the Author. **Med Chir Trans**, v. 40, p. 157-66, 1857. ISSN 0959-5287. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20896082> >.

SILLANPÄÄ, M.; HAATAJA, L.; SHINNAR, S. Perceived impact of childhood-onset epilepsy on quality of life as an adult. **Epilepsia**, v. 45, n. 8, p. 971-7, Aug 2004. ISSN 0013-9580. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15270765> >.

SILLS, G. J.; BRODIE, M. J. Update on the mechanisms of action of antiepileptic drugs. **Epileptic Disord**, v. 3, n. 4, p. 165-72, Dec 2001. ISSN 1294-9361. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11844711> >.

SILVEIRINHA, V.; STEPHENS, G. J.; CIMAROSTI, H. Molecular targets underlying SUMO-mediated neuroprotection in brain ischemia. **J**

Neurochem, v. 127, n. 5, p. 580-91, Dec 2013. ISSN 1471-4159.
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23786482> >.

SLOVITER, R. S. Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization. **Epilepsia**, v. 40 Suppl 1, p. S34-9; discussion S40-1, 1999. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10421559> >.

SMITH, M. et al. Drosophila Ulp1, a nuclear pore-associated SUMO protease, prevents accumulation of cytoplasmic SUMO conjugates. **J Biol Chem**, v. 279, n. 42, p. 43805-14, Oct 2004. ISSN 0021-9258.
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15294908> >.

SO, N. K. Depth electrode studies in mesial temporal lobe epilepsy. In: H Luders (Ed.), *Epilepsy Surgery*. Raven Press, New York, pp. 371–384, 1991.

SOMJEN, G. G. Ion regulation in the brain: implications for pathophysiology. **Neuroscientist**, v. 8, n. 3, p. 254-67, Jun 2002. ISSN 1073-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12061505> >.

SOMMER, S. et al. Covalent inhibition of SUMO and ubiquitin-specific cysteine proteases by an in situ thiol-alkyne addition. **Bioorg Med Chem**, v. 21, n. 9, p. 2511-7, May 2013. ISSN 1464-3391.
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23535560> >.

SPATT, J. et al. Predictors for negative attitudes toward subjects with epilepsy: a representative survey in the general public in Austria. **Epilepsia**, v. 46, n. 5, p. 736-42, May 2005. ISSN 0013-9580.
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857441> >.

SPENCER, S. S.; SPENCER, D. D. Entorhinal-hippocampal interactions in medial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 35, n. 4, p. 721-7, 1994 Jul-Aug 1994. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8082614> >.

STAFSTROM, C. E.; CARMANT, L. Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 6, Jun 2015. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26033084> >.

SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 43, p. 15545-50, Oct 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16199517> >.

SUTULA, T. P.; DUDEK, F. E. Unmasking recurrent excitation generated by mossy fiber sprouting in the epileptic dentate gyrus: an emergent property of a complex system. **Prog Brain Res**, v. 163, p. 541-63, 2007. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17765737> >.

SUZUKI, T. et al. A new 30-kDa ubiquitin-related SUMO-1 hydrolase from bovine brain. **J Biol Chem**, v. 274, n. 44, p. 31131-4, Oct 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531301> >.

SÜDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. **Nature**, v. 375, n. 6533, p. 645-53, Jun 1995. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7791897> >.

_____. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. **Neuron**, v. 80, n. 3, p. 675-90, Oct 2013. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24183019> >.

TANAKA, K. et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. **Science**, v. 276, n. 5319, p. 1699-702, Jun 1997. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9180080> >.

TANG, L. T.; CRAIG, T. J.; HENLEY, J. M. SUMOylation of synapsin Ia maintains synaptic vesicle availability and is reduced in an autism mutation. **Nat Commun**, v. 6, p. 7728, Jul 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26173895> >.

TATHAM, M. H. et al. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. **J Biol**

Chem, v. 276, n. 38, p. 35368-74, Sep 2001. ISSN 0021-9258.
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11451954> >.

THOM, M.; BERTRAM, E. H. Temporal lobe epilepsy. **Handb Clin Neurol**, v. 107, p. 225-40, 2012. ISSN 0072-9752. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22938974> >.

THOM, M. et al. Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome? **Ann Neurol**, v. 68, n. 4, p. 424-34, Oct 2010. ISSN 1531-8249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976764> >.

TRAUB, R. D. et al. Gap junctions, fast oscillations and the initiation of seizures. **Adv Exp Med Biol**, v. 548, p. 110-22, 2004. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15250590> >.

TRINKA, E. Epilepsy: comorbidity in the elderly. **Acta Neurol Scand Suppl**, v. 180, p. 33-6, 2003. ISSN 0065-1427. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14510818> >.

TRINKA, E. et al. Cause-specific mortality among patients with epilepsy: results from a 30-year cohort study. **Epilepsia**, v. 54, n. 3, p. 495-501, Mar 2013. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167828> >.

TURSKI, L. et al. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, v. 3, n. 2, p. 154-71, 1989. ISSN 0887-4476. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2648633> >.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**, v. 9, n. 3, p. 315-35, Sep 1983. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6639740> >.

TÉLLEZ-ZENTENO, J. F. et al. Long-term outcomes in epilepsy surgery: antiepileptic drugs, mortality, cognitive and psychosocial aspects. **Brain**, v. 130, n. Pt 2, p. 334-45, Feb 2007. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124190> >.

VAILLEND, C. et al. Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na⁺-K⁺-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. **J Neurophysiol**, v. 88, n. 6, p. 2963-78, Dec 2002. ISSN 0022-3077. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466422> >.

VAN NIEKERK, E. A. et al. Sumoylation in axons triggers retrograde transport of the RNA-binding protein La. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 31, p. 12913-8, Jul 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17646655> >.

VAROTTO, G. et al. Epileptogenic networks of type II focal cortical dysplasia: a stereo-EEG study. **Neuroimage**, v. 61, n. 3, p. 591-8, Jul 2012. ISSN 1095-9572. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22510255> >.

VENUGOPAL, A. K. et al. Transcriptomic Profiling of Medial Temporal Lobe Epilepsy. **J Proteomics Bioinform**, v. 5, n. 2, Jan 2012. ISSN 0974-276X. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23483634> >.

VICKREY, B. G. et al. Outcomes in 248 patients who had diagnostic evaluations for epilepsy surgery. **Lancet**, v. 346, n. 8988, p. 1445-9, Dec 1995. ISSN 0140-6736. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7490989> >.

VOSS, L. J. et al. Excitatory effects of gap junction blockers on cerebral cortex seizure-like activity in rats and mice. **Epilepsia**, v. 50, n. 8, p. 1971-8, Aug 2009. ISSN 1528-1167. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486358> >.

WALDBAUM, S.; PATEL, M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 88, n. 1, p. 23-45, Jan 2010. ISSN 1872-6844. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850449> >.

WALSH, C. T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; GATTO, G. J. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 44, n. 45, p. 7342-72,

Dec 2005. ISSN 1433-7851. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16267872> >.

WANG, C. Y.; SHE, J. X. SUMO4 and its role in type 1 diabetes pathogenesis. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 24, n. 2, p. 93-102, Feb 2008. ISSN 1520-7552. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17990297> >.

WANG, J. et al. Crystal structure of UBA2(ufd)-Ubc9: insights into E1-E2 interactions in Sumo pathways. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15805, Dec 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21209884> >.

WATANABE, M. et al. Developmental regulation of Ubc9 in the rat nervous system. **Acta Biochim Pol**, v. 55, n. 4, p. 681-6, 2008. ISSN 0001-527X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19039338> >.

WATANABE, Y. et al. Point mutation in syntaxin-1A causes abnormal vesicle recycling, behaviors, and short term plasticity. **J Biol Chem**, v. 288, n. 48, p. 34906-19, Nov 2013. ISSN 1083-351X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24136198> >.

WATTS, F. Z. Starting and stopping SUMOylation. What regulates the regulator? **Chromosoma**, v. 122, n. 6, p. 451-63, Dec 2013. ISSN 1432-0886. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23812602> >.

WEI, W. et al. A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 375, n. 3, p. 454-9, Oct 2008. ISSN 1090-2104. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708028> >.

WEIERGRÄBER, M. et al. Hippocampal seizure resistance and reduced neuronal excitotoxicity in mice lacking the Cav2.3 E/R-type voltage-gated calcium channel. **J Neurophysiol**, v. 97, n. 5, p. 3660-9, May 2007. ISSN 0022-3077. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376845> >.

WEILINGER, N. L. et al. Ionotropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. **Acta Pharmacol Sin**, v. 34,

n. 1, p. 39-48, Jan 2013. ISSN 1745-7254. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22864302> >.

World Health Organization. (2017). Fact Sheet No. 999: Epilepsy. Geneva: World Health Organization. Disponível em <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>>.

WILHELM, B. G. et al. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. **Science**, v. 344, n. 6187, p. 1023-8, May 2014. ISSN 1095-9203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24876496> >.

WILKINSON, K. A.; NAKAMURA, Y.; HENLEY, J. M. Targets and consequences of protein SUMOylation in neurons. **Brain Res Rev**, v. 64, n. 1, p. 195-212, Sep 2010. ISSN 1872-6321. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382182> >.

WINDEN, K. D. et al. Molecular alterations in areas generating fast ripples in an animal model of temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 78, p. 35-44, Jun 2015. ISSN 1095-953X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25818007> >.

YAMADA, T. et al. Sumoylated MEF2A coordinately eliminates orphan presynaptic sites and promotes maturation of presynaptic boutons. **J Neurosci**, v. 33, n. 11, p. 4726-40, Mar 2013. ISSN 1529-2401. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23486945> >.

YANG, X. J. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. **Bioessays**, v. 26, n. 10, p. 1076-87, Oct 2004. ISSN 0265-9247. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15382140> >.

YIN, Y. et al. Modulation of Neuronal Survival Factor MEF2 by Kinases in Parkinson's Disease. **Front Physiol**, v. 3, p. 171, 2012. ISSN 1664-042X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22661957> >.

YOKOI, N.; FUKATA, M.; FUKATA, Y. Synaptic plasticity regulated by protein-protein interactions and posttranslational modifications. **Int**

Rev Cell Mol Biol, v. 297, p. 1-43, 2012. ISSN 1937-6448. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22608556> >.

ZHANG, Y. et al. Fast and sensitive quantification of protein SUMOylation using a dual luciferase biosensor. **Analyst**, Jan 2017. ISSN 1364-5528. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28138659> >.

ZHAO, Q. et al. GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Web Server issue, p. W325-30, Jul 2014. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24880689> >.

ZUBERI, S. M. et al. A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy. **Brain**, v. 122 (Pt 5), p. 817-25, May 1999. ISSN 0006-8950. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10355668> >.

ZUCKER, R. S.; REGEHR, W. G. Short-term synaptic plasticity. **Annu Rev Physiol**, v. 64, p. 355-405, 2002. ISSN 0066-4278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11826273> >.

APÊNDICE A – Modelo experimental da ELTM: utilização da pilocarpina

A utilização de modelos experimentais para o entendimento e estudo das doenças é imprescindível. O modelo de administração de pilocarpina em animais é altamente isomórfico (características bioquímicas, comportamentais, eletrofisiológicas, farmacológicas e histológicas) com o quadro encontrado na ELT em humanos (Turski *et al.*, 1983). A pilocarpina é um agonista colinérgico, e parece também provocar as crises através da ativação do receptor muscarínico M1, pois animais *knock-out* para este receptor não desenvolvem o *status epilepticus* (SE) (Hamilton *et al.*, 1997), que é definido como crises prolongadas sem recuperação da consciência por mais de 30 minutos (Delgado-Escueta *et al.*, 1983; Scott, 2014). Também foi demonstrado que a pilocarpina pode provocar desregulação entre excitação e inibição através destes receptores *in vitro* (Priel e Albuquerque, 2002). A resposta a esta substância pode ser dividida em três períodos distintos: agudo, latente e crônico.

Inicialmente há o período agudo, que evolui rapidamente para o SE, que dura aproximadamente 8-24 horas (Curia *et al.*, 2008). O SE conduz à morte celular e reorganização sináptica do circuito hipocampal, provocando mudanças epileptogênicas permanentes (Fernandes, 2013). Esta fase inicial parece depender da ação potente em M1, pois o antagonista muscarínico atropina pode prevenir o SE (Turski *et al.*, 1983). No entanto, outros mecanismos também parecem contribuir, pois perante a manutenção das crises, a atropina se torna ineficaz (Clifford *et al.*, 1987; Khan *et al.*, 2000). Desta forma, outro mecanismo sugerido seria através de descargas originadas em neurônios hipocampais devido ao bloqueio das correntes de K^+ transmembranar. Este mecanismo explicaria a maciça ativação dos neurônios hipocampais durante o SE induzida pelo modelo. Assim, o efeito excitotóxico envolvendo os receptores glutamatérgicos e influxo de íons Ca^{2+} parece induzir a lesão neuronal (Fernandes, 2013).

Tem sido demonstrado que a taxa de mortalidade atinge 30-40% durante os primeiros dias após administração intraperitoneal de pilocarpina (300 a 400 mg/kg) (Curia *et al.*, 2008). Nos animais que sobrevivem, o dano neuronal é observado na formação hipocampal, córtex piriforme e entorrinal, tálamo, amígdala neocortex e substância negra (Turski *et al.*, 1989; Curia *et al.*, 2008). Após este evento inicial, é estabelecido o período latente, cuja duração é de aproximadamente 14-25 dias, e representa o processo epileptogênico (Curia *et al.*, 2008). A transição do período latente para o crônico parece ser paralela a alterações

na expressão dos picos interictais e oscilações de alta frequência no córtex entorrinal e na região CA3 (Salami *et al.*, 2014). Mecanismos adaptativos adicionais também ocorrem durante este período e culminam em crises epiléticas espontâneas e recorrentes, cuja frequência pode variar de 2-5 crises por semana (Turski *et al.*, 1989; Curia *et al.*, 2008). Desta forma, é possível observar alterações neurofisiológicas e comportamentais em ratos adultos que receberam pilocarpina semelhantes a ELT em pacientes (Cavalheiro, 1995).

9.1 A UTILIZAÇÃO DO INIBIDOR NEM NO PREPARO DA AMOSTRA É NECESSÁRIO PARA ANALISAR PROTEÍNAS SUMOILADAS

A administração sistêmica do agonista muscarínico pilocarpina em ratos promove alterações comportamentais e eletrográficas similares ao observado em pacientes com ELTM (Scorza *et al.*, 2009). Foram analisados o perfil de SUMOilação por SUMO-1 e SUMO-2/3 em tecido hipocampal de animais submetidos ao modelo crônico da pilocarpina. Não houve diferença significativa entre o grupo tratado e o controle (Figura 9). Cabe ressaltar que, utilizamos amostras preparadas na ausência do NEM, inibidor da deSUMOilação.

Hipocampo

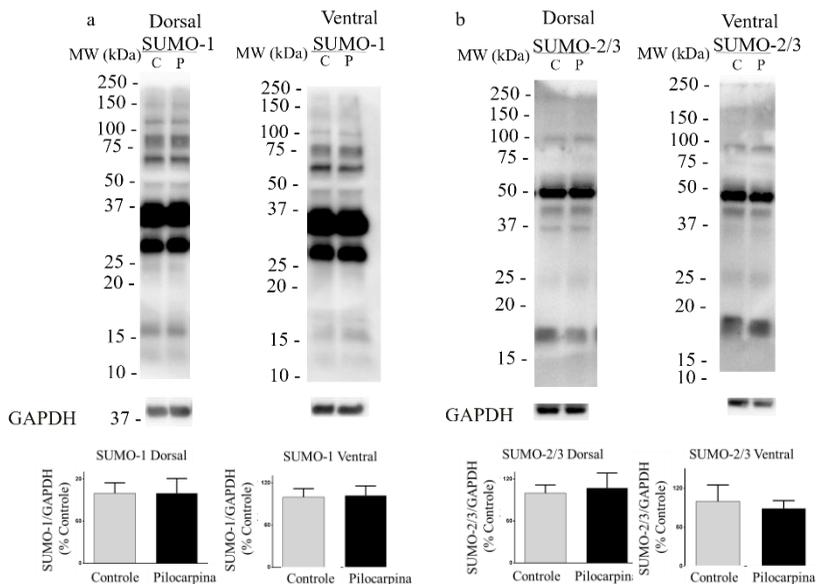


Figura 9 - Níveis globais da SUMOilação de proteínas no modelo crônico de epilepsia induzido pela pilocarpina. Imagens representativas de *Western blotting* para SUMO-1 (a) e SUMO-2/3 (b). C = controle, P = pilocarpina. Não houve diferença significativa no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral. $n = 4$, Teste *t* de Student, $p < 0,05$.

Desta forma, foram preparadas amostras de hipocampo de ratos *Wistar* com 3 meses de idade com (Figura 10a) e sem NEM (Figura 10b), para averiguar se haveria alteração no perfil de SUMOilação. De fato, houve alterações principalmente nos conjugados de SUMO-1 e SUMO-2/3, bem como na SUMO-2/3 livre.

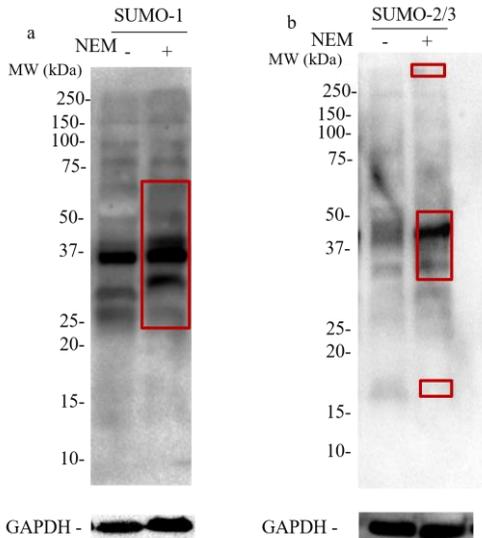


Figura 10 - Utilização do inibidor NEM e alteração no perfil de SUMOilação de proteínas em amostras de hipocampo de animais. Imagens representativas de WB para SUMO-1(a) e SUMO-2/3 (b) em amostras de hipocampo de ratos *Wistar* controle preparadas com ou sem NEM. n = 5.

O propósito inicial do trabalho foi analisar o perfil de SUMOilação em animais submetidos ao modelo de indução de SE utilizando a pilocarpina. Este modelo se apresenta altamente isomórfico com a ELT em humanos (Hamilton *et al.*, 1997; Priel e Albuquerque, 2002). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de estudo (Figura 9). Cabe ressaltar, que as amostras utilizadas não foram preparadas com o inibidor da deSUMOilação, NEM, como seria de maior interesse, nessa situação. O NEM atua estabilizando os conjugados de SUMO modificando covalentemente o grupamento tiol da cisteína catalítica em proteases específicas de SUMO. Também pode atuar em qualquer resíduo de cisteína reduzido que esteja disponível para conjugação (Suzuki *et al.*, 1999) (Figura 11).

As amostras de animais haviam sido preparadas para avaliar outros parâmetros neuroquímicos do modelo, em outro estudo. O estado SUMOilado de proteínas é transitório devido às isopeptidases como, por exemplo, as SENPs, que estão envolvidas no processo de deSUMOilação (Geiss-Friedlander e Melchior, 2007). Além disso, geralmente apenas uma pequena fração de proteínas é SUMOilada (Hay, 2005). Diversos trabalhos têm discutido a importância do uso do NEM para bloquear a

atividade das SENPs e estudar o processo da SUMOilação (Suzuki *et al.*, 1999; Eloranta e Hurst, 2002; Feligioni *et al.*, 2009; Kanakousaki e Gibson, 2012; Sommer *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017). Em um estudo prévio foi demonstrada perda na detecção de bandas de alto peso molecular de conjugados de SUMO na ausência do NEM durante o preparo da amostra para WB (Kanakousaki e Gibson, 2012). Também foi recentemente relatado diminuição na intensidade das bandas e dificuldade na detecção da SUMOilação por WB em amostras preparadas sem o NEM (Zhang *et al.*, 2017). Outro estudo mostrou ainda não ser possível a detecção da SUMO na ausência destes inibidores de protease no preparo de lisado celular (Eloranta e Hurst, 2002).

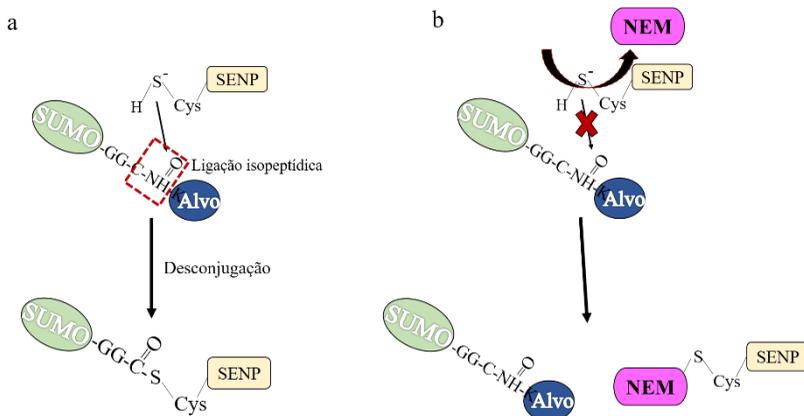


Figura 11 - O inibidor NEM previne a deSUMOilação. Representação esquemática do mecanismo pelo qual a proteína SUMO é desconjugada do seu substrato alvo, processo este que pode ser prevenido pelo uso do inibidor NEM. (a) O grupamento tiol do resíduo de cisteína presente no sítio catalítico das enzimas SENP promove a clivagem precisa da ligação isopeptídica (representada pela linha vermelha pontilhada) entre o terminal diglicina de SUMO (-GG) e o resíduo de lisina da proteína alvo (-K). (b) O NEM é um inibidor irreversível de todas as isopeptidases de cisteína, reagindo com o grupamento tiol do sítio ativo da SENP, e permitindo que a proteína SUMO mantenha-se conjugada ao substrato (Adaptado de Nayak e Müller, 2014).

Desta forma, verificamos que ao adicionar o inibidor NEM no preparo tanto das amostras dos animais (Figura 10), quanto no preparo das amostras dos pacientes (Figura 5), houve alteração dos perfis globais de SUMOilação de proteínas.

Como pôde ser observado no perfil de conjugação da SUMO-1 em hipocampo de animais controle, houve um aumento da intensidade de diversas bandas na presença do NEM. Principalmente a região entre 25-50 kDa encontra-se alterada, podendo indicar a conjugação da SUMO-1 à proteínas alvo. Poderia também ser considerado a alteração do perfil devido a interações com proteínas de baixa peso molecular mais suscetíveis à atividade das enzimas, uma vez que a diferença de algumas bandas aparenta ser menor do que a SUMO-1 livre (~12 kDa) (Figura 6a). Já para os conjugados de SUMO-2/3 houve perda da intensidade da banda de aproximadamente 37 kDa, para as amostras em que não se utilizou o NEM, bem como o surgimento de uma banda acima de 250 kDa, quando adicionado o inibidor. Esta poderia ser justificada pela presença da conjugação de uma, ou mais SUMOs, considerando que a SUMO-2/3 pode formar cadeias de poliSUMOilação (Tatham *et al.*, 2001). Também foi possível observar um aumento da banda entre 15 a 20 kDa na ausência do NEM, podendo indicar a SUMO livre como demonstrado em outros trabalhos (Smith *et al.*, 2004; Kanakousaki e Gibson, 2012) (Figura 6b).

Da mesma forma, observamos alterações no perfil de SUMOilação na amostra de hipocampo de paciente com ELTM-EH. Há tanto aumento da intensidade, como aparecimento de bandas de maior peso molecular na presença do NEM. Para SUMO-1, por exemplo, há a banda acima de 250 kDa (Figura 5a), e para SUMO-2/3 a banda entre 75-100 kDa (Figura 5b). As bandas observadas que não se alteram mediante a presença ou ausência do NEM, tanto nas amostras dos animais como nas de pacientes, podem representar proteínas conjugadas à SUMO extremamente estáveis ou apenas bandas não específicas (Kanakousaki e Gibson, 2012).

O preparo da amostra constitui uma etapa fundamental na técnica de WB. Desta forma, é de extrema importância que seja feito da maneira correta para garantir confiabilidade e reprodutibilidade na produção dos dados científicos e, conseqüentemente, para evitar a interpretação errônea dos resultados.

APÊNDICE B – Perfil de SUMOilação por SUMO-1 e SUMO-2/3 das estruturas de pacientes ELTM-EH fármacos-resistentes

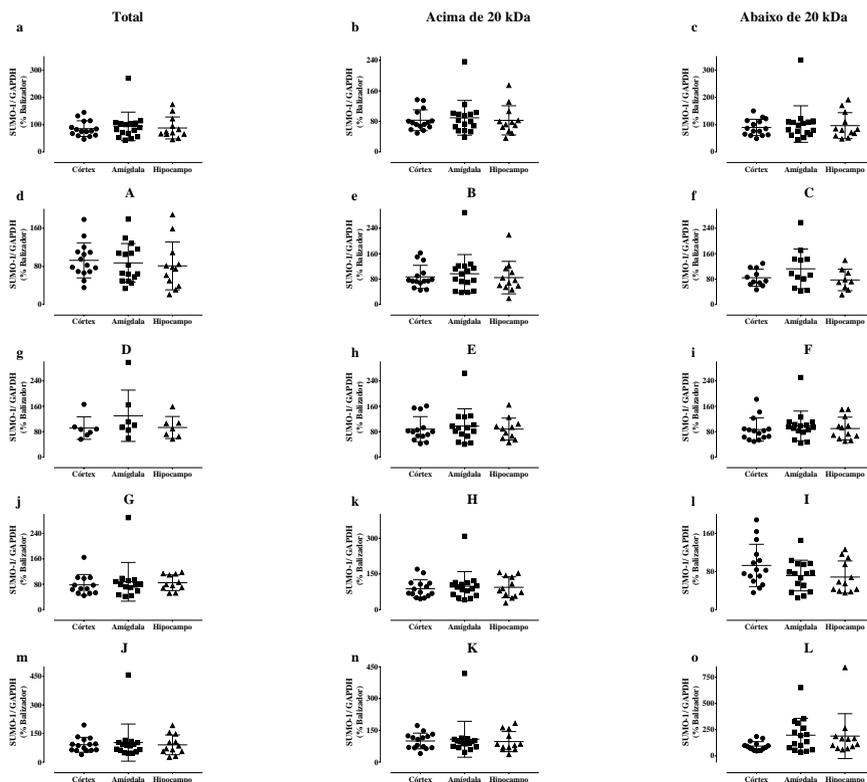


Figura 12 – Perfil total e estratificado da SUMOilação por SUMO-1 na amígdala, córtex e hipocampo de pacientes com ELTM-EH. Representação gráfica da comparação entre as diferentes estruturas de pacientes com ELTM-EH, do perfil da SUMOilação por SUMO-1: total (a), acima de 20 kDa (b), abaixo de 20 kDa (c), e das bandas indicadas na membrana região A (d), B (e), C (f), D (g), E (h), F (i), G (j), H (k), I (l), J (m), K (n), L (o). Não houve diferença significativa. $n = 16$, Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

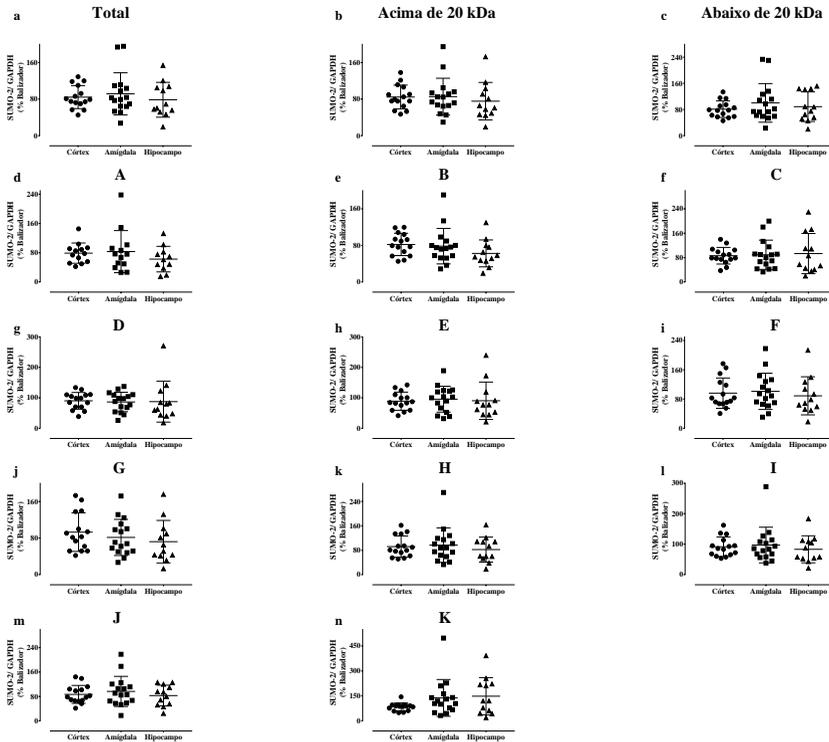


Figura 13 - Perfil total e estratificado da SUMOilação por SUMO-2/3 na amígdala, córtex e hipocampo de pacientes com ELTM-EH. Representação gráfica da comparação entre as diferentes estruturas de pacientes com ELTM-EH, do perfil da SUMOilação por SUMO-2/3: total (a), acima de 20 kDa (b), abaixo de 20 kDa (c), e das bandas indicadas na membrana região A (d), B (e), C (f), D (g), E (h), F (i), G (j), H (k), I (l), J (m), K (n). Não houve diferença significativa. $n = 16$, Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

APÊNDICE C – Proteínas SUMOizadas no cérebro humano

(Material Suplementar)

APÊNDICE D – Genes diferencialmente expressos na ELTM-EH

(Material Suplementar)

ANEXO A – Artigo científico relacionado a dissertação

Neuronal Signaling (2017) 1 NS20160010
DOI: 10.1042/NS20160010



Review Article

SUMOylation and calcium signalling: potential roles in the brain and beyond

Leticia Coelho-Silva¹, Gary J. Stephens² and Helena Cimarosti¹

¹Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ²School of Pharmacy, University of Reading, Reading, U.K.

Correspondence: Helena Cimarosti (helena.cimarosti@ufsc.br)



Small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation (or SUMOylation) is a post-translational protein modification implicated in alterations to protein expression, localization and function. Despite a number of nuclear roles for SUMO being well characterized, this process has only started to be explored in relation to membrane proteins, such as ion channels. Calcium ion (Ca^{2+}) signalling is crucial for the normal functioning of cells and is also involved in the pathophysiological mechanisms underlying relevant neurological and cardiovascular diseases. Intracellular Ca^{2+} levels are tightly regulated; at rest, most Ca^{2+} is retained in organelles, such as the sarcoplasmic reticulum, or in the extracellular space, whereas depolarization triggers a series of events leading to Ca^{2+} entry, followed by extrusion and reuptake. The mechanisms that maintain Ca^{2+} homeostasis are candidates for modulation at the post-translational level. Here, we review the effects of protein SUMOylation, including Ca^{2+} channels, their proteome and other proteins associated with Ca^{2+} signalling, on vital cellular functions, such as neurotransmission within the central nervous system (CNS) and in additional systems, most prominently here, in the cardiac system.

Introduction

The small ubiquitin-like modifier (SUMO) was first described as targeting nuclear proteins that regulate transcription factors, gene expression and DNA integrity [1]. Experiments with knockout mice for the sole SUMO conjugating enzyme, ubiquitin-like conjugating enzyme 9 (Ubc9), demonstrated nuclear dysfunction and embryonic lethality, confirming that SUMOylation is physiologically indispensable [2]. Reports that are more recent have shown that SUMO can also target cytosolic and membrane proteins, including ion channels, to regulate crucial cellular functions, such as plasma membrane depolarization and neurotransmission [3,4]. So far, the majority of studies have focused on SUMOylation of potassium (K^+) channels, which are involved in setting the duration and firing pattern of action potentials [5]. For example, SUMOylation can modulate both two-pore domain K^+ (K2P) channels [3,6–9], responsible for the regulation of background leak currents, and voltage-dependent K^+ (K_v) channels [10–13] that repolarize cell membrane during action potential input. However, there is also recent evidence that voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCCs) [14] and transient receptor potential (TRP) channels [15], both of which can mediate Ca^{2+} influx, are SUMO targets. Considering the utmost relevance of Ca^{2+} in physiological and pathophysiological processes, and the growing evidence that SUMO can modify ion channels, our review focused on the potential roles of SUMOylation of Ca^{2+} channels and proteins related with Ca^{2+} signalling with a focus on the central nervous system (CNS) and, also, the cardiac system.

SUMOylation pathways

Post-translational modifications of proteins can affect their function, localization and degradation depending on the stimulus applied, to control cellular response [16,17]. SUMOylation is a reversible lysine-targeted post-translational modification, whereby covalently conjugated SUMO regulates proteins in numerous pathways [18,19]. Currently, there are five proposed SUMO isoforms, with SUMO-1, 2

Received: 25 April 2017
Revised: 10 July 2017
Accepted: 11 July 2017

Accepted Manuscript Online:
12 July 2017
Version of Record published:
19 July 2017