



ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA SUBSTÂNCIA BRANCA DO POLO ANTERIOR DO LOBO TEMPORAL DE INDIVÍDUOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO CIRÚRGICO DE EPILEPSIA ASSOCIADA A ESCLEROSE HIPOCAMPAL.

Vítor Henri Baldim¹, Bruna Cunha Zaidan¹, Marina Koutsodontis Machado Alvim², Enrico Ghizoni², Helder Tedeschi², Fernando Cendes², Fabio Rogerio¹.

¹ Anatomia Patológica, FCM, UNICAMP, ² Neurologia, FCM, UNICAMP.

1. Resumo do projeto de pesquisa:

Epilepsia é a doença neurológica mais comum, acomete indivíduos de qualquer faixa etária e é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um problema de saúde pública. As crises epiléticas consistem em episódios transitórios repentinos de atividade elétrica anormal em grupos de neurônios de uma determinada região, podendo se espalhar pelo córtex (Steinhauser et al., 2016). As crises podem ser focais ou generalizadas, sendo um subtipo de epilepsia focal a Epilepsia de Lobo Temporal (ELT), esta possui diversas causas, dentre elas a Esclerose Hipocampal (EH).

Em estudos de neuroimagem é possível observar alterações de substância branca (SB) em pacientes com Epilepsia de Lobo Temporal, requerendo maior esclarecimento sobre a natureza de tais alterações (Eijdsen et al., 2011). Neste estudo, pretendemos realizar análise histopatológica da SB (populações oligodendroglial e astrocitária) de pacientes portadores de ELT associada a EH, refratários a tratamento medicamentoso, e que foram submetidos a amigdalohipocampectomia e lobectomia temporal anterior (AHCLTA), comparando os espécimes cirúrgicos do polo anterior do lobo temporal com amostras de indivíduos controles.

Utilizando marcadores específicos para estudo da população de oligodendrócitos (Luxol Fast Blue (LFB) – coloração especial; CNPase – imunoistoquímica) e de astrócitos (GFAP – imunoistoquímica) na SB, pretendemos verificar possíveis diferenças no grupo epilepsia em relação ao grupo controle, sendo que este último é composto por espécimes de indivíduos submetidos à necropsia e sem histórico de doença neurológica.

2. Objetivos:

2.1. Geral:

Estudar alterações histopatológicas da SB de espécimes cerebrais de pacientes submetidos a AHCLTA no Hospital de Clínicas (HC) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) entre janeiro de 2013 e dezembro de 2017 para tratamento de ELT associada com EH.

2.2. Específicos:

Identificar os indivíduos portadores de ELT refratária associada a EH, submetidos à AHCLTA, acompanhados no HC da Unicamp entre janeiro 2013 e dezembro 2017. Descrever achados histopatológicos observados na SB superficial (SBS, 500 µm de profundidade na SB a partir da transição entre as substâncias branca e cinzenta) e profunda (SBP, à partir de 500 µm considerando o limite da SB superficial) (Schurr et al., 2016) em espécimes de pacientes submetidos a cirurgia para tratamento de ELT associada com EH e comparar com grupo controle. Avaliar, através de estudo morfológico, à microscopia de luz (coloração especial e imunoistoquímica), as populações oligodendroglial e astrocitária da SB do polo anterior do lobo temporal de pacientes submetidos a cirurgia para tratamento de ELT associada com EH e comparar com grupo controle.

3. Materiais e métodos:

3.1. Grupos de estudo:

Foram estudados 25 indivíduos (n=25) divididos em dois grupos: (i) um grupo controle, composto por 10 indivíduos (n=10), e (ii) um grupo de pacientes submetidos à cirurgia para tratamento de epilepsia composto por 15 indivíduos (n=15). Como controle, foram utilizadas amostras de lobo temporal obtidas de indivíduos adultos sem doença neurológica de base, os quais foram submetidos a necropsia no HC/Unicamp. Além disso, foram coletados dados clínicos dos pacientes por meio de pesquisa nos respectivos prontuários médicos, para verificar possíveis correlações.

3.2. Critérios de inclusão:

Pacientes adultos (maiores de 18 anos), de ambos os sexos, com diagnóstico clínico-radiológico de ELT associada com EH, esta última comprovada histologicamente, e cujos espécimes cirúrgicos estejam contidos em blocos de parafina em adequado estado de conservação para realização de técnicas histológicas e de imunoistoquímica.

3.3. Critérios de exclusão:

Qualquer paciente com diagnóstico-radiológico de ELT associada com EH, cujas características clínicas ou do espécime cirúrgico correspondente, não sejam contempladas nos critérios de inclusão.

3.4. Análise histológica e classificação dos espécimes cirúrgicos:

Os cortes histológicos obtidos (4 µm) foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e posteriormente avaliados para se confirmar a presença dos achados morfológicos utilizados para a classificação histopatológica de EH

conforme os critérios apresentados pela Liga Internacional de Epilepsia (ILAE; do inglês, *International League Against Epilepsy*) (Blümcke et al., 2013).

3.6. Análise da coloração especial e das marcações imunoistoquímicas:

A análise da SB nos espécimes cirúrgicos foi feita utilizando-se lâminas coradas em LFB ou submetidas a protocolo imunoistoquímico de GFAP (marcador astrocitário) ou CNPase (marcador de mielina) com a finalidade de semi-quantificar a marcação obtida por meio de cada técnica. Esta semi-quantificação foi realizada em dois compartimentos da SB arbitrariamente determinados, conforme descrito por Schurr et al (2016): SB superficial (até 500µm na SB, a partir da transição com a substância cinzenta) e SB profunda (a partir de 500µm da transição com a substância cinzenta). Para cada indivíduo, foram fotodocumentados aleatoriamente (microscópio Zeiss Axiophot 2 acoplado a câmera Olympus DP72), de cada compartimento, entre 7 e 10 campos de grande aumento (CGA; objetiva de 40x).

Para análise das imagens de coloração especial (LFB) ou de imunomarcação (CNPase ou GFAP) foi utilizado o programa ImageJ® (versão 1.50i, disponível gratuitamente no site do National Institutes of Health-U.S., <https://www.nih.gov>). Neste programa, foi empregada a técnica de processamento para aumento de contraste binário (*thresholding*, na versão original em inglês). Através desta técnica, a imagem analisada foi inicialmente transformada em escala de cinza e, em seguida, convertida em informação binária, isto é, preto e branco. Para tal conversão, o operador do software definiu visualmente um ponto de corte na escala de cinza que mantivesse, da forma mais fidedigna possível, as características da marcação (intensidade e contraste com o fundo) observadas nas imagens coloridas. Particularmente, a esta escala de cinza correspondem valores numéricos que variam de 0 (preto) a 255 (branco). Desta forma, valores na escala de cinza abaixo do ponto de corte se tornam pretos e, aqueles acima, brancos. Por fim, o software soma os valores de cinza de todos os pixels do campo histológico avaliado e divide pelo número total de pixels do mesmo campo em análise, fornecendo um valor definido como *média* (*mean*, na versão original em inglês). Assim, através desta forma de avaliação da coloração especial e da imunomarcação, foi realizada uma análise que contemplou a distribuição da positividade na área amostrada/fotodocumentada.

3.7. Análise estatística:

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (sexo, grupo), com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%), e estatísticas descritivas das variáveis numéricas (idade, *média* da marcação para LFB nas SBs superficial e profunda, *média* da marcação para CNPase nas SBs profunda e superficial, *média* da marcação para GFAP nas SBs profunda e superficial), com valores de média, desvio padrão, valores mínimo e máximo, mediana e quartis. Para comparação das variáveis categóricas entre os grupos foram utilizados os testes Qui-Quadrado ou exato de Fisher (para valores esperados menores que 5). Para comparação das variáveis numéricas entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney (2 grupos), devido à ausência de distribuição normal das variáveis. Para analisar a relação entre as variáveis numéricas foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman, devido à ausência de distribuição normal das variáveis. Para comparação dos valores dos marcadores entre si foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas, devido à ausência de distribuição normal das variáveis e ao tamanho dos grupos. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $P < 0.05$.

3.8. Aspectos éticos:

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp (CEP), sob número CAAE 02200418.7.0000.5404 e Parecer número 3.087.964.

4. Resultados obtidos no período do presente relatório:

Nas análises não foram encontradas diferenças quanto a sexo, lado acometido ou idade do início das crises entre os dois grupos.

4.1. Coloração especial - LFB:

A coloração especial LFB evidenciou distribuição homogênea de mielina nas substâncias brancas superficial e profunda, não sendo evidenciadas diferenças qualitativas entre os grupos avaliados (Figura 1). Para avaliação semiquantitativa, foi realizada a técnica de processamento para aumento de contraste binário nas imagens representativas (campos histológicos) das amostras dos indivíduos de cada grupo (para detalhes vide itens 3.6 e 3.7). Não foram observadas diferenças significativas entre as médias de área marcada (valor *mean*) no grupo controle e aquela do grupo dos pacientes com epilepsia (Figura 2).

4.2 Avaliação imunoistoquímica - CNPase:

A imunomarcação para CNPase exibiu distribuição homogênea de mielina nas substâncias brancas superficial e profunda, não sendo observadas diferenças qualitativas entre os grupos avaliados (Figura 3). À avaliação semiquantitativa das imagens representativas (campos histológicos) das amostras dos indivíduos de cada grupo por meio do software ImageJ®, não foram observadas diferenças significativas entre os valores (*mean*) de cada grupo (Figura 4).

4.3 Avaliação imunoistoquímica - GFAP:

Nos dois grupos, a investigação imunoistoquímica para GFAP evidenciou prolongamentos astrocitários com marcação citoplasmática. À comparação qualitativa, não foram observadas diferenças com relação à espessura e densidade de tais prolongamentos. Tal fato foi verificado tanto ao se comparar campos representativos das substâncias brancas superficiais e profundas num mesmo grupo, quanto ao se comparar os dois grupos (controles e epilepsia) (Figura 5). Após a avaliação semiquantitativa dos campos histológicos representativos das amostras dos indivíduos de cada grupo por meio do software ImageJ®, não foram detectadas diferenças significativas entre os valores (*mean*) de cada grupo (Figura 6).

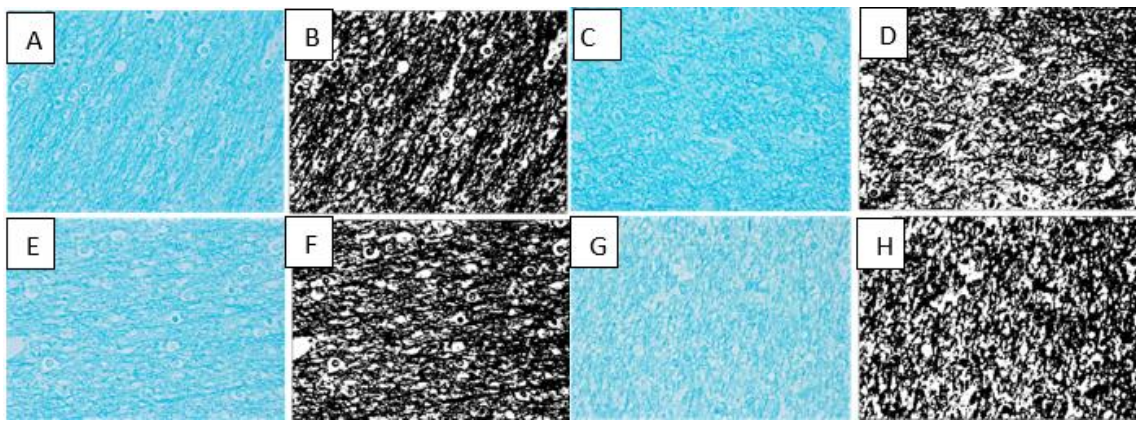


Figura 1. Coloração especial Luxol Fast Blue (LFB) na substância branca superficial (A, B, C e D) e profunda (E, F, G e H) de espécimes dos grupos controle e paciente. Em A, C, E e G observamos campos histológicos representativos da substância branca corados pelo LFB, sendo A e E do grupo controle, C e G do grupo de pacientes, representando a SBS e SBP, respectivamente. Em B, D, F e H observamos as imagens correspondentes após o processamento digital das fotos mostradas em A, C, E e G respectivamente, para aplicação da técnica de processamento para aumento de contraste binário no programa ImageJ. Não foram observadas diferenças qualitativas entre os dois compartimentos avaliados na substância branca (superficial e profunda). Objetiva 40x (A-H).

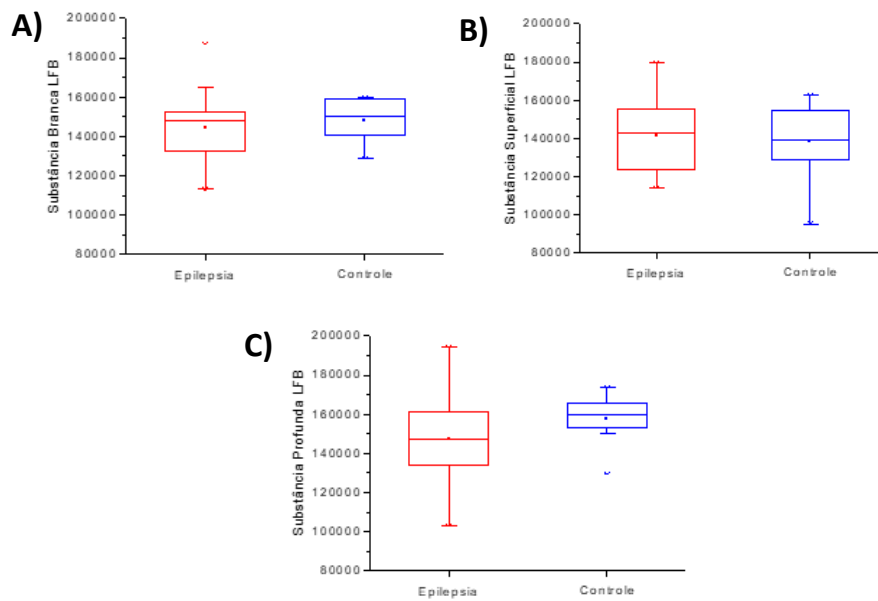


Figura 2. Análise semiquantitativa por meio do software ImageJ® da coloração por Luxol Fast Blue (LFB) da substância branca dos grupos controle e epilepsia. Em A), gráfico representativo das médias dos valores *mean* obtidos para a substância branca (isto, é, considerando em conjunto todos os campos histológicos da SBS e SBP documentados para cada indivíduo) em cada grupo. Em B e C, gráficos correspondentes às médias dos valores *mean* obtidos apenas para a substância branca superficial (B) ou profunda (C) para cada grupo. Não foram detectadas diferenças entre os grupos em todas as avaliações.

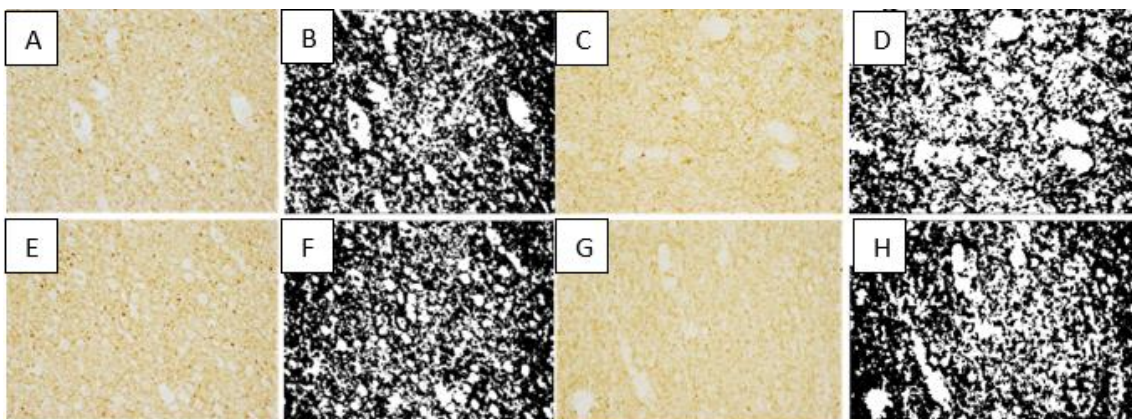


Figura 3. Imunohistoquímica CNPase na substância branca superficial (A, B, C e D) e profunda (E, F, G e H) de espécimes dos grupos controle e paciente. Em A, C, E e G observamos campos histológicos representativos da substância branca marcados por CNPase, sendo A e E do grupo controle, C e G do grupo de pacientes, representando a SBS e SBP, respectivamente. Em B, D, F e H observamos as imagens correspondentes após o processamento digital das fotos mostradas em A, C, E e G respectivamente, para aplicação da técnica de processamento para aumento de contraste binário no programa ImageJ. Não foram observadas diferenças qualitativas entre os dois compartimentos avaliados na substância branca (superficial e profunda). Objetiva 40x (A-H).

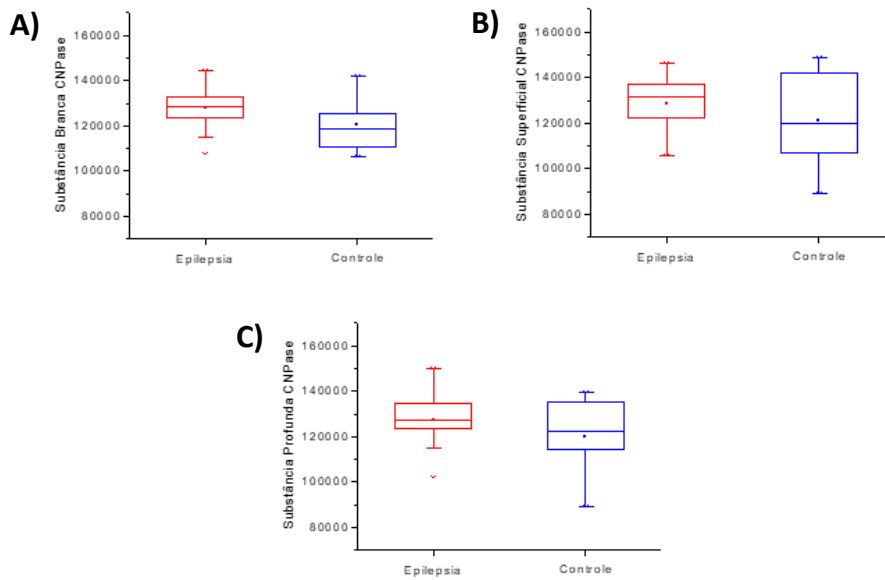


Figura 4. Análise semiquantitativa por meio do software ImageJ® da imuno-histoquímica por CNPase da substância branca dos grupos controle e epilepsia. Em A), gráfico representativo das médias dos valores *mean* obtidos para a substância branca (isto, é, considerando em conjunto todos os campos histológicos da SBS e SBP documentados para cada indivíduo) em cada grupo. Em B e C, gráficos correspondentes às médias dos valores *mean* obtidos apenas para a substância branca superficial (B) ou profunda (C) para cada grupo. Não foram detectadas diferenças entre os grupos em todas as avaliações.

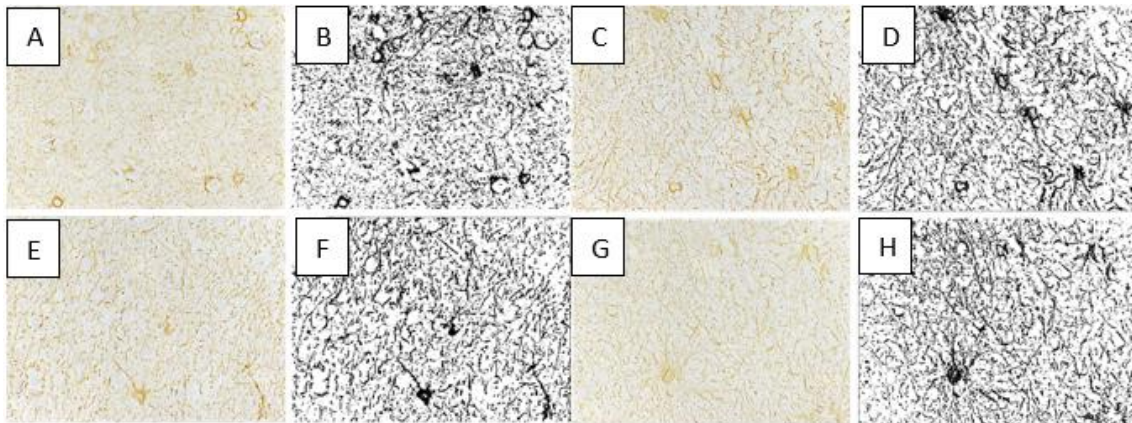


Figura 5. Imunohistoquímica GFAP na substância branca superficial (A, B, C e D) e profunda (E, F, G e H) de espécimes dos grupos controle e paciente. Em A, C, E e G observamos campos histológicos representativos da substância branca marcados por GFAP, sendo A e E do grupo controle, C e G do grupo de pacientes, representando a SBS e SBP, respectivamente. Em B, D, F e H observamos as imagens correspondentes após o processamento digital das fotos mostradas em A, C, E e G respectivamente, para aplicação da técnica de processamento para aumento de contraste binário no programa ImageJ. Não foram observadas diferenças qualitativas entre os dois compartimentos avaliados na substância branca (superficial e profundo). Objetiva 40x (A-H).

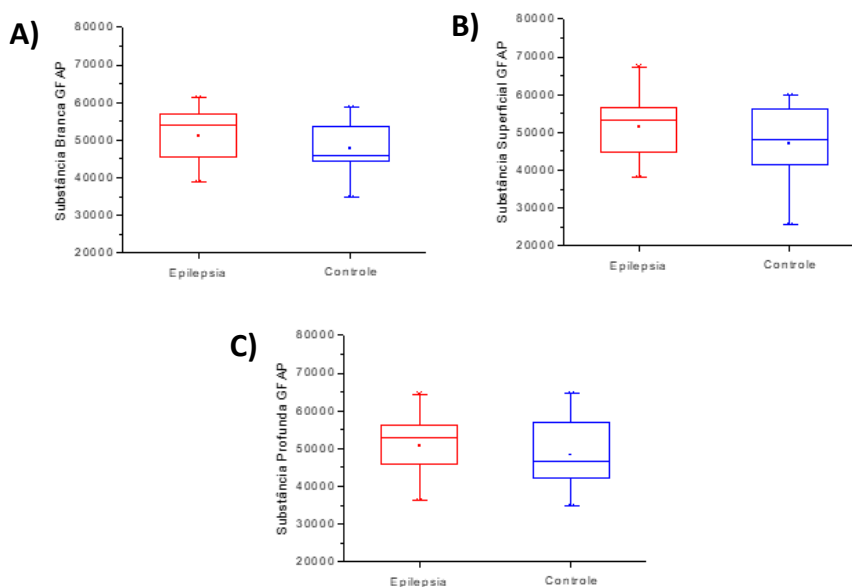


Figura 6. Análise semiquantitativa por meio do software ImageJ® da marcação por GFAP da SB dos grupos controle e epilepsia. Em A), gráfico representativo das médias dos valores *mean* obtidos para a substância branca (isto, é, considerando em conjunto todos os campos histológicos da SBS e SBP documentados para cada indivíduo) em cada grupo. Em B e C, gráficos correspondentes às médias dos valores *mean* obtidos apenas para a substância branca superficial (B) ou profunda (C) para cada grupo. Não foram detectadas diferenças entre os grupos em todas as avaliações.

5. Discussão:

No presente estudo, avaliamos a SB do polo anterior do lobo temporal de pacientes submetidos a cirurgia para tratamento de ELT associada com EH. Utilizamos técnicas histológicas (coloração especial e imunoistoquímica) para avaliar as populações oligodendroglial (LFB e CNPase) e astrocitária (GFAP). Ainda que estudos prévios tenham descrito alterações da SB verificadas por meio de técnicas de neuroimagem (Gross et al., 2006; Knake et al., 2009), não detectamos diferenças, sob o aspecto histopatológico, entre os pacientes com epilepsia e indivíduos controle em nossa população. É possível que diferenças técnicas tenham contribuído, ao menos em parte, para a divergência entre nossos resultados e aqueles descritos por outros grupos de pesquisa.

Concha et al. (2010), Garbelli et al. (2012), procuraram correlações entre neuroimagem e alterações histopatológicas em espécimes de pacientes com histórico de epilepsia crônica. Nestes estudos, os indivíduos foram comparados entre si e categorizados segundo achados de neuroimagem.

Concha et al observaram através da microscopia eletrônica, que o grupo portador de ELT associada a EMT apresentava maior área extra-axonal (definida pela área não ocupada por axônios ou mielina), menor fração de mielina (que expressa a fração da área total de um campo ocupada por mielina), menor circunferência axonal cumulativa, menor número de axônios por campo e menor densidade axonal. Por outro lado, a espessura da mielina e o diâmetro dos axônios não diferiam entre os grupos. Desta forma, os autores concluíram que há correlação positiva entre a AF e a circunferência axonal cumulativa, assim como entre a AF e a densidade axonal; além de correlação negativa entre a AF e a espessura da mielina (Concha et al., 2010).

Por sua vez, Garbelli et al. (2012) estudaram indivíduos portadores de ELT associada a EH, os autores verificaram, no subgrupo de pacientes submetidos ao protocolo como coloração para mielina, que os espécimes dos indivíduos do grupo com uma alteração de imagem designada por borramento da SB branca e cinzenta exibiam um sinal não homogêneo na substância branca, com hipersinal nas regiões mais profundas, e redução da AF. Na análise morfológica, o grupo 1 apresentou marcação não homogênea da substância branca, com áreas mais intensas e menos intensas, confirmada por Black-Gold II e azul de toluidina. Por outro lado, a marcação no grupo sem estas alterações de imagem foi homogênea.

Nos trabalhos de Concha et al. (2010) e Garbelli et al. (2012) os autores compararam indivíduos com epilepsia entre si, buscando verificar se determinada alteração de neuroimagem apresentava correlato com eventual alteração histológica e/ou ultraestrutural, sendo que, nos dois trabalhos, correlações foram descritas. Em nosso estudo, buscamos avaliar alterações histológicas comparando espécimes de pacientes com história de epilepsia de longa duração por EH, independentemente de informações de neuroimagem, com amostras de indivíduos controles (sem histórico de doenças neurológicas). Além disso, os métodos de investigação microscópica empregados por Concha et al. (2010) e Garbelli et al. (2012) são mais sensíveis que aqueles que utilizamos (colorações especiais e imunoistoquímica). Particularmente, os outros autores utilizaram técnicas de microscopia eletrônica e de microscopia ótica (campos histológicos avaliados por meio de objetiva de 100X); em nosso estudo, usamos técnicas de análise por meio de microscopia ótica (campos histológicos avaliados por meio de objetiva de 40X), pois consideramos ser este um protocolo de mais fácil acesso por parte de diferentes grupos de pesquisa.

Na casuística do presente estudo, avaliamos pacientes com ELT associada a EH e um grupo controle sem alterações histológicas. Conforme já considerado anteriormente, a topografia e o período que avaliamos na evolução temporal da epilepsia podem ter determinado a ausência de diferença entre os grupos que avaliamos, quando foram consideradas tanto a SB superficial quanto a profunda dos espécimes corados com LFB ou imunomarcados por CNPase.

Concluimos que, pela presente metodologia empregada (análise digital por meio do software ImageJ de marcação para CNPase ou GFAP e de coloração por LFB) não foram detectadas diferenças na SB do polo anterior do lobo temporal entre os espécimes de pacientes com ELT e EH e aqueles de indivíduos controles. É possível que estudos futuros com a mesma metodologia, porém avaliando outras topografias dos mesmos espécimes (especificamente o giro parahipocampal) ou amostras de indivíduos com epilepsia e menor tempo de evolução da doença possam evidenciar alterações histológicas que se correlacionem com alterações detectadas nos exames de neuroimagem. Desta forma, em conjunto, tais informações poderiam contribuir com o melhor conhecimento da evolução cronológica de achados morfológicos (macro e microscópicos) no lobo temporal de indivíduos com epilepsia, bem como de eventual identificação de marcadores de prognóstico/evolução.

6. Referências bibliográficas:

- Steinhauser, C., Grunnet, M., Carmignoto, G. (2016) Crucial role for astrocytes in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 323: 157–169.
- Eijsden, P.V., Otte, W.M, W., Hel, W.S.V.D., et al. (2011) In vivo diffusion tensor imaging and ex vivo histologic characterization of white matter pathology in a post–status epilepticus model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 52(4): 841–845.
- Schurr, J., Coras, R., Rössler, K. et al. (2016) Mild Malformation of Cortical Development with Oligodendroglial Hyperplasia in Frontal Lobe Epilepsy: A New Clinico-Pathological Entity. *Brain Pathol.*, 27(1): 26-35.
- Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., et al. (2013) International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, 54(7): 1315-1329.
- Garbelli, R., Milesi, G., Medici, V., et al. (2012) Blurring in patients with temporal lobe epilepsy: clinical, high-field imaging and ultrastructural study. *Brain*, 135(8): 2337-2349.
- Gross, D., Concha, L., Beaulieu, C., (2006) Extratemporal White Matter Abnormalities in Mesial Temporal Lobe Epilepsy Demonstrated with Diffusion Tensor Imaging. *Epilepsia*, 47(8): 1360–1363.
- Knake S., Salat D.H., Halgren E. et al. (2009) Changes in white matter microstructure in patients with TLE and hippocampal sclerosis. *Epileptic Disord.*, 11(3): 244-50.
- Concha, L., Livy, D., Beaulieu, C., et al. (2010) In Vivo Diffusion Tensor Imaging and Histopathology of the Fimbria-Fornix in Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, 30(3): 996–1002.
- Lockwood, G., Thom, M., Focke, N., et al. (2012) Correlating 3T MRI and histopathology in patients undergoing epilepsy surgery. *Journal of Neuroscience Methods*, 205: 182–189.