

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

Palavras-Chave: Epilepsia, Giro parahipocampal, Glia, Imuno-histoquímica.

Autores/as:

VÍTOR HENRI BALDIM (FCM – UNICAMP)

BRUNA CUNHA ZAIDAN (FCM – UNICAMP)

MARINA KOUTSODONTIS MACHADO ALVIM (FCM – UNICAMP)

PROF. DR. ENRICO GHIZONI (FCM – UNICAMP)

PROF. DR. HELDER TEDESCHI (FCM – UNICAMP)

PROF. DR. FERNANDO CENDES (FCM – UNICAMP)

PROF. DR. FABIO ROGÉRIO (orientador) (FCM – UNICAMP)

INTRODUÇÃO:

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 associa-se frequentemente à Esclerose Hipocampal (EH).

Desta forma, diversas topografias extra-hipocampais podem estar envolvidas na gênese de crises epiléticas, dentre elas o giro parahipocampal (GPH). Especificamente, o GPH situa-se próximo ao hipocampo, sendo que ambas as estruturas têm funções relacionadas à memória (Machado et al 2014). O giro parahipocampal de pacientes com ELT comparado com aquele de controles normais apresenta aumento da amplitude de flutuação de baixa frequência (ALLF, do inglês *amplitude of low-frequency fluctuation*), que é uma medida da atividade cerebral no repouso feita através de ressonância magnética. Tal fato sugere que o GPH contribua com origem das crises nesses pacientes (Singh et al 2020). O giro parahipocampal, a amígdala e o hipocampo são comumente considerados regiões epileptogênicas em pacientes com ELT e a abordagem cirúrgica destas topografias pode levar a controle de crises em 40 a 65% dos pacientes com ELT refratária (Gleichgerrcht et al 2020).

Em estudos de RM é possível observar alterações de substância branca (SB) em pacientes com ELT, requerendo maior esclarecimento sobre a natureza de tais alterações (Eijdsen et al., 2011). Neste estudo, pretendemos realizar análise histopatológica da SB do GPH de pacientes com ELT associada a EH, refratários a tratamento medicamentoso, e que foram submetidos a amigdalohipocampectomia e lobectomia temporal anterior (AHLTA). Utilizando imunomarcadores teciduais específicos para estudo da população de oligodendrócitos

(CNPase), de astrócitos (GFAP) e de micróglia (Iba1) na SB, buscamos verificar possíveis diferenças no grupo epilepsia em relação a indivíduos controles.

METODOLOGIA:

Foram estudados 21 indivíduos (n=21) divididos em dois grupos: (i) Controle, composto por 7 indivíduos (n=7), e (ii) Indivíduos submetidos à AHLTA para tratamento de epilepsia, composto por 14 indivíduos (n=14). Como controle, foram utilizadas amostras de GPH obtidas de indivíduos adultos submetidos à necropsia no HC/Unicamp e sem histórico de doença neurológica. 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).

A análise da SB nos espécimes cirúrgicos foi feita utilizando-se lâminas submetidas a protocolo imunistoquímico com a finalidade de semi-quantificar a marcação obtida. Para cada indivíduo, foram fotodocumentados (microscópio Zeiss Axiophot 2 acoplado a câmera Olympus DP72) aleatoriamente entre 7 e 10 campos histológicos (20x) da SB.

Para análise das imagens de imunomarkação (CNPase, GFAP e Iba1) 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 (Figura 1).

Por fim, o software soma os valores de todos os pixels da imunomarkação no campo histológico avaliado e divide pelo número total de pixels do mesmo campo, fornecendo um valor definido como *média* (*mean*, na versão original em inglês).

Assim, através desta forma de avaliação da imunomarkação foi realizada uma análise que contemplou a distribuição da positividade na área amostrada/fotodocumentada.

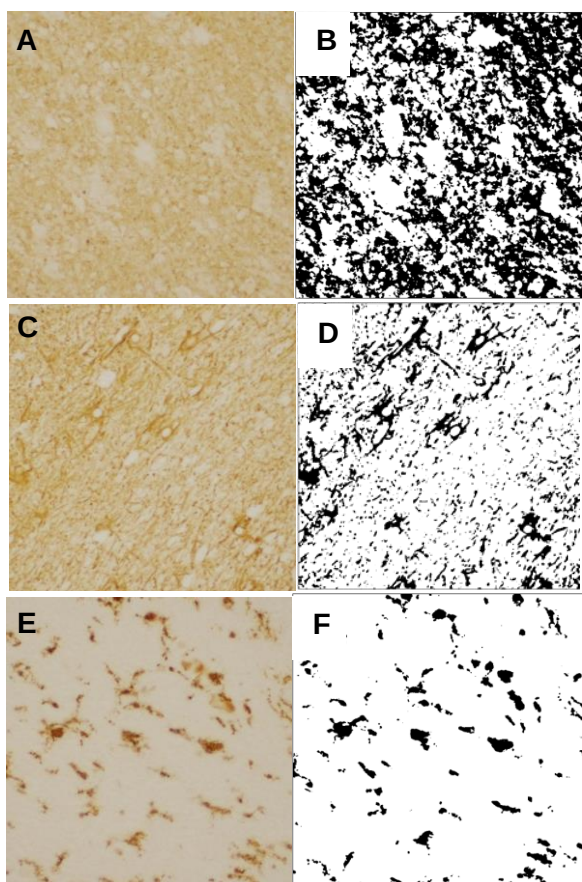


Figura 1: Imunomarkação para CNPase (A), GFAP (C) e Iba 1 (E) na SB do giroparahipocampal. Em A, C e E campos histológicos imunomarcados representativos. Em B, D e F imagens correspondentes após o processamento digital das fotos mostradas em A, C e E, respectivamente, para aplicação da técnica de processamento para aumento de contraste binário no programa ImageJ. Objetiva 20x.

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 CNPase na SB, *média* da marcação para GFAP na SB, *média* da marcação para Iba1 na SB), 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% ($p < 0,05$).

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.

RESULTADOS:

As análises imuno-histoquímicas para GFAP e Iba1 evidenciaram prolongamentos citoplasmáticos astrocitários e microgliais, respectivamente. Após a avaliação semiquantitativa, o grupo de indivíduos com epilepsia apresentou menores valores (*mean*) para marcação por GFAP ($p < 0,05$) e valores maiores para Iba1 ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle. A imunomarcação para CNPase mostrou distribuição homogênea de mielina na substância branca e não evidenciou diferença entre os grupos ($p > 0,05$) (Figuras 1 e 2).

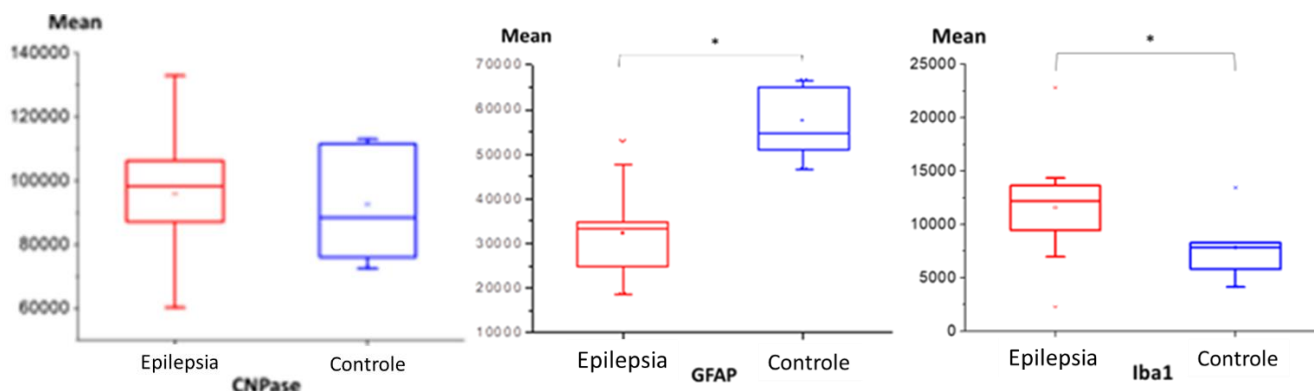


Figura 2: Análise semi-quantitativa (valores de “*mean*”) de imunomarcação para CNPase, GFAP e Iba1 na substância branca do giro parahipocampal. * $p < 0,05$.

DISCUSSÃO e CONCLUSÃO:

A epilepsia é uma doença associada a disfunção de redes neuronais. Estudos mais recentes buscam uma compreensão mais ampla do que ocorre na substância branca de pacientes com epilepsia e, mais especificamente, na ELT associada a EH (Eijdsen et al., 2011).

A EH é o achado neuropatológico mais comum observado em casos de ELT submetidos a tratamento cirúrgico. Em alguns casos, porém, considera-se a participação de estruturas temporais que não o hipocampo na gênese das crises, dentre as quais a substância branca do polo anterior do lobo temporal, além de estruturas extra-temporais (Garbelli et al., 2012; Thom, 2014; Deleo et al., 2018). Neste sentido, sabe-se que o acometimento estrutural pode estender-

se para a substância branca de outras topografias como o giro do cíngulo, o giro parahipocampal, o fórnix da fímbria e o tálamo (Concha et al., 2010, Liu et al., 2012).

Alterações na substância branca têm sido investigadas em diversas condições que cursam com epilepsia. Especificamente, Kendal et al. (1999) utilizaram técnica de exame estereológico para comparar, quanto à positividade de imunomarcadores, um grupo de pacientes portadores de ELT associada a esclerose mesial temporal (EMT) com um grupo controle. Os autores observaram que o grupo de pacientes apresentava redução do número de células positivas para GFAP em relação ao grupo controle na topografia do giro parahipocampal.

Shapiro et al 2008, conduziram um estudo experimental, buscando entender a resposta das linhagens celulares astrocitária e microglial. Como metodologia, usaram o modelo de indução de estado epiléptico com pilocarpina em ratos Sprague-Dawley. Os autores observaram, após um dia de indução, hipertrofia das células GFAP-positivas. Ainda, fizeram reconstruções tridimensionais computadorizadas das células Iba1-positivas ao longo de cinco dias, evidenciando alteração morfológica desta linhagem, com espessamento e aumento do número dos prolongamentos citoplasmáticos. Os autores propuseram que a ativação destas duas linhagens celulares ocorreria de formas diferentes, do ponto de vista espacial e temporal, e que eventos teciduais, como a hipertrofia das células GFAP-positivas residuais e reativas, poderiam compensar a perda de células do mesmo tipo devido a morte após crises induzidas por pilocarpina. Tais eventos compensatórios levariam à ausência de alterações observadas em certas análises metodológicas, como a técnica de densitometria (Shapiro et al, 2018).

O giro parahipocampal, em conjunto com a amígdala e o hipocampo, são comumente considerados regiões que gerariam as crises em pacientes com ELT, sendo que a abordagem cirúrgica destas topografias pode levar ao controle das crises em 40 a 65% dos pacientes com ELT previamente classificada como resistente a fármacos (Gleichgerricht et al 2020).

No presente trabalho, propusemo-nos a estudar, por meio de técnicas histopatológicas, a SB do GPH de indivíduos com epilepsia e EH. A padronização adequada de imunomarcagem específica para a população celular glial da SB permitiu a identificação de proteínas de cada tipo celular: CNPase (que detecta proteína de oligodendrócitos), GFAP (que reconhece proteína astrocitária), e Iba1 (que identifica proteínas da micróglia) (Deleo et al., 2018, Ahmed et al., 2007). Concluímos que a imunomarcagem de tais proteínas permitiu a avaliação e comparação da SB de ambos os grupos, possibilitando verificar diferença significativa de marcação para GFAP e Iba1. A correlação entre esses dados teciduais e alterações de neuroimagem apresentadas por pacientes com epilepsia por EH (Garbelli et al., 2012) requer novas avaliações futuras.

BIBLIOGRAFIA:

- Steinhauser, C., Grunnet, M., Carmignoto, G., (2016) Crucial role for astrocytes in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 323: 157–169.
- Machado, A, Haertel, L, & Campos, G. 2014, *Neuroanatomia Funcional*, n.p.: São Paulo, SP: Atheneu, 2014
- Singh, T., B., Aisikaer, A., He, C., et al (2020) The Assessment of Brain Functional Changes in the Temporal Lobe Epilepsy Patient with Cognitive Impairment by Resting-state Functional Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Clinical Imaging Science*, 10(50).
- Gleichgerricht, E., Keller, S., S., Drane, D., L., et al. (2020) Temporal Lobe Epilepsy Surgical Outcomes Can Be Inferred Based on Structural Connectome Hubs: A Machine Learning Study. *Ann. Neurol.*, 88(5):970-983
- 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.
- 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.
- Thom, M. (2014) Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(5): 520-543.
- Deleo, F., Thom, M., Concha, L., et al. (2018) Histological and MRI markers of white matter damage in focal epilepsy. *Epilepsy Research.*, 140: 29–38.
- 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.
- Liu, M., Concha, L., Lebel, C., et al (2012) Mesial temporal sclerosis is linked with more widespread white matter changes in temporal lobe epilepsy. *NeuroImage: Clinical*, 1: 99–105.
- Shapiro, L., A., Wang, L., Ribak, C., E., (2008) Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsia*, 2: 33-41.
- Ahmed, Z., Shaw, G., Sharma, V.P., et al (2007) Actin-binding Proteins Coronin-1a and IBA-1 Are Effective Microglial Markers for Immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(7): 687–700, 2007.