



DISTRIBUIÇÃO E SEVERIDADE DA ASTROCITOSE NO HIPOCAMPO E NEOCÓRTEX DE DOENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL POR ESCLEROSE MESIAL: CORRELAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA.

Mestrado Integrado em Medicina | 2011/12

ICBAS | Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

UP | Universidade do Porto

Diogo José Nunes Carneiro

Orientador: Professor Dr. Joaquim Luis Ramos Torres Couto Reis

Co-Orientador: Dr. Ricardo Taipa

DISTRIBUIÇÃO E SEVERIDADE DA ASTROCITOSE NO HIPOCAMPO E NEOCÓRTEX DE DOENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL POR ESCLEROSE MESIAL: CORRELAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA.

Diogo José Nunes Carneiro

Aluno do 6º ano - Mestrado Integrado em Medicina
ICBAS-CHP
Rua de Jorge Viterbo Ferreira n.º 228
4050-313 Porto
Portugal

Orientador:

Professor Dr. Joaquim Luis Ramos Torres Couto Reis

Assistente Hospitalar, Serviço de Neurocirurgia
Hospital Santo António - CHP
Lg Prof Abel Salazar
4099 - 001 Porto
Portugal

Co-Orientador:

Dr. Ricardo Taipa

Assistente Hospitalar, Unidade de Neuropatologia
Hospital Santo António - CHP
Lg Prof Abel Salazar
4099 - 001 Porto
Portugal

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Joaquim Reis pela solicitude e por ter orientado este trabalho.

Ao Dr. Ricardo Taipa, pelo acompanhamento contínuo, fundamental à concretização deste projeto.

ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common neurologic problems worldwide. Partial seizures are the commonest in adults where the most prevalent arise from the mesial temporal lobe. Mesial temporal sclerosis is the commonest underlying cause of this disease.

Pathologic examination was classically described as a neuronal loss in the hippocampus, predominantly in the CA1, CA3, CA4 regions and dentate gyrus with relative sparing of the CA2 region. The dense gliosis with astrocyte proliferation that accompanies the loss of neurons causes shrinkage and hardening of tissue. Hippocampal changes are typically characterized by reorganization and sprouting of the fibers on the mossy fiber pathway.

We reviewed the cases of temporal lobe resections carried out on Centro Hospitalar do Porto in the period January 2006-2012. The hippocampal regions and neocortex were identified with Hematoxylin and eosin, Luxol fast blue and NeuN stained sections. The astrocytosis of the different regions was classified in the Glial Fibrillary Acidic Protein immunohistochemistry stained sections, using a semiquantitative scale developed for grading it.

The highest astrocytosis' score was found on CA1 and the lowest on the CA2 region. The neocortex region had as well a significant astrocytosis' score. We also found that astrocytosis' score on CA3 correlates inversely with Subiculum's score. A significant relation between astrocytic pattern and clinical features was not found.

With this methodology we noticed the same pattern of gliosis reported in classic studies (see above). Moreover, we deduce a pattern of electric impulse propagation parallel to the long term potentiation circuit based on the different patterns of gliosis distribution. The neocortex is also affected by the same glial reaction, suggesting a possible extra-hippocampal contribution in the pathophysiology of mesial temporal sclerosis.

KEY WORDS: Temporal Lobe Epilepsy; Mesial Temporal Lobe Sclerosis; Astrocytes.

RESUMO

A epilepsia é um dos problemas neurológicos mais comum em todo o mundo. As crises focais são as mais comuns na idade adulta, sendo o lobo temporal mesial o foco mais frequente. A Esclerose mesial do lobo temporal é causa subjacente mais comum.

O exame neuropatológico das áreas afetadas é descrito classicamente como uma perda neuronal no hipocampo, principalmente nas regiões de CA1, CA3, CA4 e giro denteado, sendo a região de CA2 relativamente poupada. A reação glial intensa associada à proliferação de astrócitos reativos que acompanha a perda neuronal, causa retração e endurecimento dos tecidos. A nível hipocampal ocorre também uma reorganização dos neurónios da via das fibras musgosas, conhecida como *sprouting*.

Foram estudados os casos de cirurgia por epilepsia do lobo temporal efetuadas no Centro Hospitalar do Porto no período compreendido entre janeiro de 2006 e janeiro de 2012. O hipocampo e neocórtex foram identificados recorrendo às colorações de Hematoxilina Eosina, *Luxol Fast Blue* e estudo imunoistoquímico com NeuN. O grau de astrocitose foi classificado com o recurso ao estudo imunohistoquímico com *Glial Fibrillary Acidic Protein* usando uma escala semiquantitativa concebida para o efeito.

O grau de astrocitose mais elevado foi encontrado na região de CA1 e o mais baixo em CA2. Foi também observada uma astrocitose significativa no neocórtex. Obteve-se uma correlação inversamente proporcional entre CA3 e o *Subiculum*. Não foi encontrada qualquer correlação estatisticamente significativa entre os parâmetros clínicos e o padrão de astrocitose.

Recorrendo a esta metodologia deparámo-nos com o mesmo padrão de gliose descrito classicamente (ver acima). Além disso, foi possível deduzir um padrão de propagação do impulso elétrico baseado em diferentes padrões de distribuição de gliose. Os resultados obtidos no neocórtex sugerem uma contribuição extra-hipocampal na patofisiologia da esclerose mesial do lobo temporal.

PALAVRAS CHAVE: Epilepsia do lobo temporal, Esclerose mesial do lobo temporal, Astrócitos.

LISTA DE ABREVIATURAS:

CA: *Cornu Ammonis*

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

EMLT: Esclerose Mesial do Lobo Temporal

GD: Giro Denteado

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*

H&E: *Hematoxilina Eosina*

LFB: *Luxol Fast Blue*

PLP: Potenciação a Longo Prazo

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SUB: *Subiculum*

INTRODUÇÃO

A Epilepsia é um dos problemas neurológicos mais comum em todo o mundo. Nos últimos anos obtiveram-se avanços importantes no diagnóstico e tratamento desta patologia, no entanto, o conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares da epileptogénese é ainda incompleto [1].

Epilepsia, ou síndrome epilético, corresponde à condição crónica na qual o doente apresenta crises epiléticas recorrentes, desencadeadas por um mecanismo subjacente [2]. A epilepsia abrange um conjunto de síndromes muito heterogéneo que têm como semelhanças fundamentais a hiperexcitabilidade, o hypersincronismo e a predisposição ao aparecimento de crises recorrentes, não provocadas [1,3]. A crise epilética, corresponde ao evento paroxístico que ocorre devido a descargas elétricas anómalas, excessivas e síncronas de um agregado de neurónios do córtex cerebral e que é finito no tempo [2].

A incidência desta patologia ronda os 50 novos casos por 100.000 habitantes por ano nos países desenvolvidos e pensa-se que nos países em vias de desenvolvimento este número seja ainda superior [4]. A incidência segue uma distribuição bimodal com uma maior incidência de casos nos primeiros 20 anos de vida e depois dos 60. As crises focais são as mais comuns na idade adulta. Dentro destas, as crises com ponto de partida no lobo temporal mesial, em estruturas como o hipocampo, amígdala e o córtex parahipocampal [Epilepsia do Lobo Temporal (ELT)] são as mais frequentes [5]. A Esclerose Mesial do Lobo Temporal (EMLT) é a lesão mais comumente associada [6].

Apesar de, na maioria dos casos, a etiologia da EMLT ser desconhecida, pensa-se que está geralmente associada a um evento índice como convulsões febris, *status epilepticus*, tumores, meningite, encefalite, doença cerebrovascular [7], e que a esclerose hipocampal represente a via final comum das diferentes causas [1]. Para além disso, fatores genéticos e anomalias no desenvolvimento podem contribuir para uma maior suscetibilidade às crises e ao dano hipocampal. O momento em que ocorre o insulto pode ser crítico no desenvolvimento da esclerose hipocampal. Existe geralmente um período de alguns anos entre o insulto e o aparecimento da ELT [8].

Clinicamente, a ELT associa-se frequentemente a crises que geralmente se iniciam na infância, caracterizadas por automatismos repetitivos, estereotipados e sem propósito, que se podem acompanhar por perda, ou não, de consciência. Um número substancial destes dentes têm crises secundariamente generalizadas [9]. As crises são geralmente precedidas por

aura, caracterizada por manifestações disautonómicas, náusea, desconforto epigástrico, ansiedade e sensações do tipo *dejà vu*. A confusão pós-ictal pode também ocorrer após este tipo de crises, surgindo nos minutos que se seguem à crise [10]. A EMLT apresenta-se como uma doença de curso progressivo que culmina na refratariedade ao tratamento farmacológico em um terço dos doentes [11]. Nestes casos, a cirurgia, que consiste regra geral, na ressecção do lobo temporal anterior, toma um papel preponderante no tratamento eficaz desta patologia, ficando grande parte dos doentes sem crises a longo prazo [12]. No *follow-up* dos doentes submetidos a cirurgia pode ser usada a escala de Engel. Esta escala permite classificar os doentes de acordo com o número de crises pós-cirurgia em quatro classes, desde o doente que se mantém sem crises (classe I), ao doente que não obteve melhoria sintomática com a cirurgia (classe IV) [13].

O exame neuropatológico do hipocampo nestes doentes revela uma perda neuronal no hipocampo, envolvendo predominantemente a região hilar, *cornu ammonis* (CA)1, CA3, CA4 e giro denteado (GD), sendo relativamente poupada a região de CA2 [14] (figura 1). Acompanhando a perda neuronal, desenvolve-se uma reação glial, com proliferação de astrócitos reativos causando um endurecimento e retração dos tecidos [1].

No hipocampo de doentes com EMLT, ocorre reorganização das redes neuronais, principalmente na via das fibras musgosas, que envolve o GD e CA1 conhecida por *sprouting*. Esta alteração estrutural é tida como um mecanismo que leva à formação de circuitos excitatórios recorrentes que pode funcionar quer como via facilitadora da transmissão das crises[15], quer como ponto de partida destas [16].

A identificação da EMLT por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é fundamental para a orientação do tratamento cirúrgico e os achados imagiológicos correlacionam-se com as observações anatomopatológicas [17], demonstrando-se: atrofia hipocampal, hipersinal em T2 e perda da sua estrutura interna com hiposinal em T1 [17]. Alterações de sinal sem atrofia cortical é um achado relativamente inespecífico que pode ser encontrado em mais de 30% de indivíduos sem a doença [18]. Alterações bilaterais na RMN são observadas em aproximadamente 20% dos indivíduos com ELT [17].

O presente estudo centra-se na descrição da distribuição e grau de astrocitose nos fragmentos de hipocampo e neocórtex dos doentes submetidos a cirurgia por ELT por esclerose mesial (ELT-EMLT). Tentar-se-à também estabelecer uma potencial correlação do grau de astrocitose entre as diversas

estruturas observadas, assim como entre estas e as características demográficas e clínicas destes doentes.

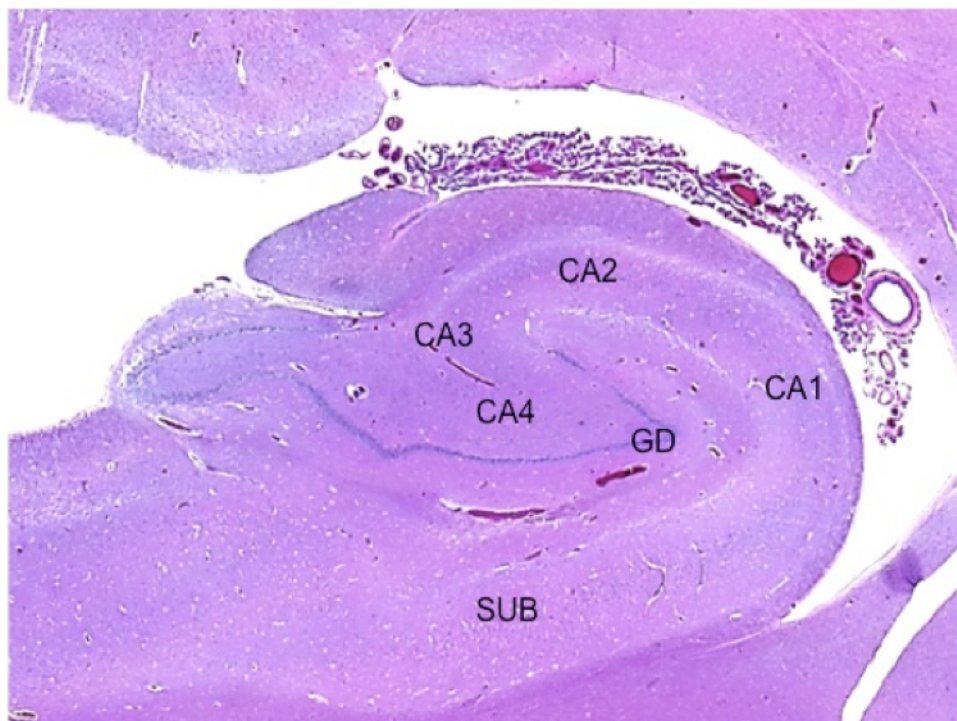


Figura 1: Corte histológico do hipocampo, com as áreas que o constituem representadas.

Legenda: CA – Cornu Amonis; GD – Giro Denteado; SUB - Subiculum

MATERIAL E MÉTODOS

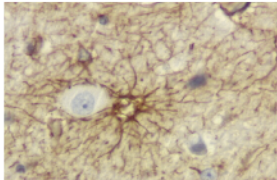
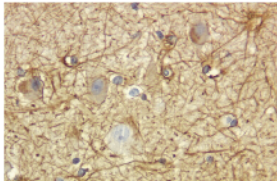
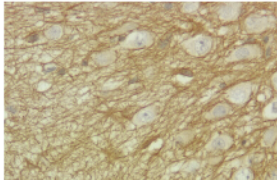
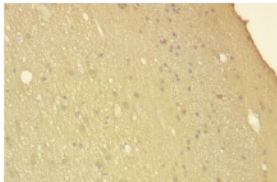
Foram observados cortes histológicos de fragmentos obtidos em cirurgias de ELT por EMLT, de doentes seguidos na consulta de epilepsia do Hospital de Santo António do Centro Hospitalar do Porto, submetidos a cirurgia no período de janeiro de 2006 a janeiro de 2012. Foram avaliados 21 casos com EMLT, sendo avaliados os fragmentos utilizados pela Unidade de Neuropatologia no algoritmo diagnóstico.

A identificação anatómica das diferentes áreas do hipocampo (GD, CA4, CA3, CA2, CA1, subiculum [SUB]) e de neocórtex temporal (NEO) foi efetuada com recurso às colorações de Hematoxilina Eosina (H&E), *Luxol Fast Blue* (LFB) e imunoistoquímica com NeuN.

A avaliação do grau de astrocitose e gliose foi feita recorrendo ao estudo imunocitoquímico com *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP), tendo sido atribuído

um grau de astrocitose de acordo com a escala semi-quantitativa concebida para o efeito: Grau 1 – ligeira (menos de 3 astrócitos reativos por campo de 400x); Grau 2 - moderada (menos de 50% das células presentes no campo correspondentes a astrócitos reativos); Grau 3 – severa (mais de 50% das células presentes no campo correspondentes a astrócitos reativos); Grau 4 – muito severa (ausência ou raros astrócitos reativos na presença de gliose grave, perda neuronal completa e esclerose), Tabela I.

Tabela I: Escala de Classificação da Astrocitose através da contagem de astrócitos reactivos corados com GFAP

Grau	Descrição	Imagem
1 – Ligeira	Menos de três astrócitos reactivos por campo	
2 – Moderada	Menos de 50% das células presentes no campo correspondem a astrócitos reactivos	
3 – Severa	Mais de 50% das células presentes no campo correspondentes a astrócitos reactivos	
4 – Muito severa	Ausência ou raros astrócitos reactivos na presença de gliose grave, perda neuronal completa e esclerose	

Foram incluídos no estudo os seguintes dados demográficos: sexo; idade; história de crises febris na infância; idade de início das crises; idade da cirurgia; tempo de epilepsia e o *score* de Engel no 1º e 2º ano após cirurgia (nos casos em que se aplica). Os dados foram obtidos com recurso ao processo clínico.

Foi obtido o parecer positivo por parte da comissão de ética do mesmo centro para o presente estudo no dia 21 de janeiro de 2012.

Fez análise de frequências estatísticas de todas as variáveis em estudo. No estudo das correlações utilizou-se o *Kendal's tau* e *Spearman's rank correlation coefficient* (SPSS, Inc.)

RESULTADOS

DADOS DEMOGRÁFICOS

Foram incluídos no estudo 21 doentes, sendo 12 do sexo feminino e 9 do sexo masculino com média de idades de 42 anos. Dos 21 doentes, 16 (76%) têm história de convulsões febris na infância.

Os restantes resultados da análise de frequências dos dados demográficos encontram-se representados na tabela II.

Tabela II: Análise de Frequências de dados demográficos

Variável	Média (anos)	Desvio Padrão	Mínimo (anos)	Máximo (anos)
Idade	42	10,1	26	61
Idade de início das crises	12	7,5	1	28
Idade da cirurgia	39	10,2	23	59
Tempo de Epilepsia	27	8,5	10	44

Dos 21 doentes operados, 19 mantiveram-se sem crises (Engel 1) ao fim de um ano (90,5%) e 17 ao fim de 2 anos (81%).

DADOS NEUROPATOLÓGICOS

Foram analisados cortes de hipocampo dos 21 doentes, sendo classificadas as áreas de GD, CA4, CA3, CA2, SUB, e NEO de acordo com a escala acima referida, tendo-se obtido os resultados seguintes (Tabela III e figura 2):

Tabela III: Análise de Frequências de astrocitose nas áreas estudadas.

Área	ND*	Reação glial		Média	DP	Mínimo	Máximo
GD	0	Ligeira Moderada Grave Muito Grave	1 8 12 0	2,52	0,060	1	3
CA4	1	Ligeira Moderada Grave Muito Grave	4 5 9 3	2,52	0,98	1	4
CA3	1	Ligeira Moderada Grave Muito Grave	6 7 3 4	2,25	1,12	1	2
CA2	2	Ligeira Moderada Grave Muito Grave	3 16 0 0	1,84	0,38	1	2
CA1	1	Ligeira Moderada Grave Muito Grave	4 3 0 13	3,10	1,29	1	4
SUB	1	Ligeira Moderada Grave Muito Grave	2 10 8 0	2,30	0,66	1	3
NEO	2	Ligeira Moderada Grave Muito Grave	3 12 4 0	2,05	0,62	1	3

Legenda: ND - Não Disponível, DP - Desvio Padrão, GD - Giro Denteado, CA - Cornu Amonis, SUB - Subiculum, NEO - Neocortex

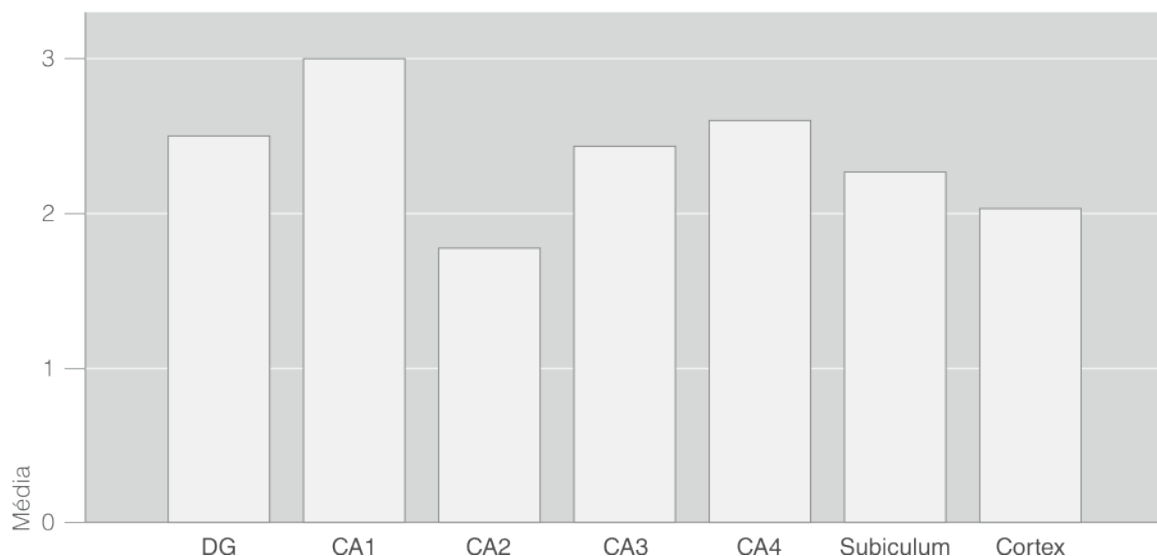


Figura 2: Gráfico da distribuição da astrocitose pelas áreas em estudo

Os resultados mostram que a área cujo *score* de astrocitose é mais elevado é CA1, e a que a área de *score* mais baixo corresponde a CA2. Para além de ser a região com menos reação astrocitária média, CA2 é também a área com menos variação de padrão de astrocitose (todos os indivíduos com astrocitose ligeira ou moderada).

Através dos testes estatísticos de *Kendal's tau* e *Spearman's rank correlation coefficient* foram cruzados os dados neuropatológicos com os dados clínicos (idade de início das crises, convulsões febris na infância, idade da cirurgia, anos de epilepsia, escala de Engel ao primeiro e segundo ano após cirurgia) não tendo sido encontrada qualquer correlação estatisticamente significativa entre os dados clínicos e neuropatológicos.

Entre as regiões anatómicas em estudo verificou-se uma correlação negativa entre CA3 e SUB ($p < 0,01$) e uma correlação positiva entre o DG e SUB ($p < 0,01$); CA3 e CA4 ($p < 0,01$). Através do teste de Qui-quadrado, foi feita a correlação entre a presença de convulsões febris e o *score* de astrocitose de cada uma das áreas do hipocampo separadamente, não tendo sido estatisticamente significativa. Foi ainda feita *a posteriori* uma correlação entre o rácio CA3/SUB e tempo de epilepsia que não foi estatisticamente significativa.

Tabela IV: Correlações segundo os testes de *Kendal's Tau* e *Spearman's rank*

			DG	CA1	CA2	CA3	CA4	Subic	Cortex
Kendal's tau	DG	Coeficiente de Correlação Significância N	1,000 . 21	,388 ,072 20	-,089 ,700 19	-,209 ,312 20	,365 ,071 21	,714** ,001 20	,073 ,741 19
	CA1	Coeficiente de Correlação Significância N	,388 ,072 20	1,000 . 20	-,088 ,696 19	,018 ,932 19	-,067 ,743 20	,192 ,367 20	,125 ,565 19
	CA2	Coeficiente de Correlação Significância N	-,089 ,700 19	-,088 ,696 19	1,000 . 19	,227 ,294 19	,131 ,550 19	-,269 ,237 19	,000 1,000 18
	CA3	Coeficiente de Correlação Significância N	-,209 ,312 20	,018 ,932 19	,227 ,294 19	1,000 . 20	,561** ,004 20	-,668** ,001 19	,041 ,848 18
	CA4	Coeficiente de Correlação Significância N	,365 ,071 21	-,067 ,743 20	,131 ,550 19	,561** ,004 20	1,000 . 21	-,032 ,877 20	,046 ,826 19
	Subic	Coeficiente de Correlação Significância N	,714** ,001 20	,192 ,367 20	-,269 ,237 19	-,668** ,001 19	-,032 ,877 20	1,000 . 20	,100 ,646 19
	Cortex	Coeficiente de Correlação Significância N	,073 ,741 19	,125 ,565 19	,000 1,000 18	,041 ,848 18	,046 ,826 19	,100 ,646 19	1,000 . 19
Spearman's rank	DG	Coeficiente de Correlação Significância N	1,000 . 21	,412 ,071 20	-,091 ,712 19	-,225 ,340 20	,398 ,074 21	,732** ,000 20	,079 ,749 19
	CA1	Coeficiente de Correlação Significância N	,412 ,071 20	1,000 . 20	-,092 ,708 19	,005 ,983 19	-,073 ,761 20	,210 ,374 20	,133 ,588 19
	CA2	Coeficiente de Correlação Significância N	-,091 ,712 19	-,092 ,708 19	1,000 . 19	,247 ,308 19	,141 ,565 19	-,279 ,247 19	,000 1,000 18
	CA3	Coeficiente de Correlação Significância N	-,225 ,340 20	,005 ,983 19	,247 ,308 19	1,000 . 20	,603** ,005 20	-,720** ,001 19	,058 ,819 18
	CA4	Coeficiente de Correlação Significância N	,398 ,074 21	-,073 ,761 20	,141 ,565 19	,603** ,005 20	1,000 . 21	-,032 ,894 20	,076 ,756 19
	Subic	Coeficiente de Correlação Significância N	,732** ,000 20	,210 ,374 20	-,279 ,247 19	-,720** ,001 19	-,032 ,894 20	1,000 . 20	,110 ,653 19
	Cortex	Coeficiente de Correlação Significância N	,079 ,749 19	,133 ,588 19	,000 1,000 18	,058 ,819 18	,076 ,756 19	,110 ,653 19	1,000 . 19

**. Correlação com $p < 0,01$

DISCUSSÃO

Ao analisar as frequências dos *scores* de gravidade das diferentes áreas do hipocampo, constata-se que a área mais afetada corresponde a CA1, e a área mais poupada CA2. Para além disso, todas as áreas, à exceção de CA2, têm um *score* médio de gliose superior a 2 (grave a muito grave) tendo a área de CA2 um *score* médio de gliose de 1,85 (entre ligeira a moderada). Estes achados estão de acordo com a descrição neuropatológica clássica da ELT-EMLT feita por Sommer no século XIX e, ainda hoje, aceite que consiste em atrofia, proliferação glial e perda neuronal predominantemente na região de CA1, CA3, CA4 e giro denteado, sendo relativamente poupada a região de CA2 [19].

Estudos neurofisiológicos de fragmentos de hipocampo pós-cirurgia e em modelos animais, mostraram que a maioria dos doentes com ELT fármaco-resistente tem crises com ponto de partida no hipocampo, tendo-se verificado uma hiperexcitabilidade nas células granulares e nas células piramidais [20,21] que, sob certas condições, é suficiente para suplantar a ação dos interneurónios inibitórios. Para além disso foi também encontrada uma correlação entre o grau de hiperexcitabilidade, nestes tipos celulares, e o grau de reorganização sináptica na via das fibras musgosas, também conhecido como *sprouting*, descrito acima, e que corresponde a uma forma de plasticidade celular observada quer nos doentes quer em modelos experimentais de ELT-EMLT [22].

A reorganização sináptica na via das fibras musgosas, segundo alguns autores, é descrita como um ponto chave das crises [15]. Esta via faz parte do mecanismo de potenciação a longo prazo (PLP) do hipocampo, que permite a aquisição de memória declarativa. Segundo este processo, a informação sensorial proveniente do córtex entorrinal projeta-se nas células granulosas do giro denteado, dando origem à via perfurante. As células granulosas, por sua vez, emitem projeções que as ligam às células piramidais da área de CA3, constituindo a via das fibras musgosas. A via das fibras musgosas, parte de CA3 e projeta-se em CA1, pela via colateral de Schaffer, que por sua vez se projeta no *subiculum* como porta de saída do circuito hipocampal [23].

Analisando o circuito de PLP, constata-se que CA2 não intervém neste circuito, o que nos permite colocar a hipótese de que, eventualmente esta área, não recebendo qualquer projeção das fibras descritas como ponto de partida das crises (via das fibras musgosas), não terá um papel ativo na génese ou progressão das crises e, como tal, não sofre gliose significativa. Atendendo aos

dados da análise feita, a área de CA2 também não se correlaciona estatisticamente com nenhuma das outras áreas estudadas, o que pode corroborar as hipóteses colocadas. Ainda assim, para o real esclarecimento do papel de CA2 nas crises, seriam necessários estudos ulteriores das conexões sinápticas do hipocampo.

Como já foi referido, a hipótese mais consensual na gênese da ELT por EMLT consiste na hiperexcitabilidade das células da via das fibras musgosas que é facilitado pela plasticidade dos neurónios desta via, processo conhecido como *sprouting* [22]. Segundo a descrição clássica, esta via percorre o trajeto desde as células granulosas do giro dentado até às células piramidais de CA3 que, por sua vez, se projeta em CA1 pela via de Schaffer. Em modelos experimentais e em estudos com animais, constatou-se que os neurónios de CA1 também podem sofrer *sprouting*, podendo as células piramidais adquirir uma estrutura semelhante às de CA3 [24]. Sabe-se também que CA1 se projeta no *subiculum*, reconhecido como a porta de saída do circuito do circuito hipocampal [25]. Assumindo que as células de CA1 possam adquirir a mesma plasticidade que as de CA3, surge a hipótese de que poderá haver um conjunto de células (GD, CA3 e CA1) que têm um fenótipo hiperexcitável, com capacidade de sofrer *sprouting* e que se projetam no *subiculum*, estrutura à qual este mecanismo de neuroplasticidade não se encontra, para já, descrito [26]. Com estes dados teóricos e com a correlação negativa obtida entre o *score* de gliose de CA3 e SUB ($p < 0,01$) pode-se levantar a hipótese de que quanto menor é a reação glial em CA3, maior terá sido a plasticidade nessa área (que para existir, exige menor perda neuronal), havendo a possibilidade de propagação do impulso até ao *subiculum*, levando à projeção do impulso nesta área, contribuindo para a haja perda neuronal e consequente gliose, inversamente proporcional à de CA3. Segundo esta hipótese, seria de esperar igualmente uma correlação similar entre o CA1 e o *subiculum*, o que não se verificou. No campo das hipóteses teóricas, e principalmente porque estamos a inferir processos dinâmicos através da observação de um estadio terminal, podemos admitir que o processo de epileptogénese nestas duas áreas possa ter patofisiologias, contribuições, circuitos ou tempos de evolução diferentes. Para além disso, a sub-região de CA1 é das mais vulneráveis a insultos, nomeadamente a isquemia, que podem ter ocorrido noutro contexto, e interferir com estes resultados [27]. Admitindo que o processo epileptogénico que leva ao *sprouting* em CA3 fosse mais lento, induzindo a longo termo uma resposta astrocitária/gliótica mais intensa ao nível do *subiculum*, foi feita uma correlação

entre o rácio de patologia CA3/SUB e o tempo de epilepsia que, não mostrou correlação estatisticamente significativa. O tamanho da amostra é igualmente pequeno, associado ainda ao facto de a região de CA1 estar severamente afetada em todos os casos, limitando a interpretação deste tipo de relações dinâmicas dentro da formação hipocampal.

O presente estudo, ao classificar semiquantitativamente o grau de gliose através da contagem de astrócitos reativos, baseia-se apenas no resultado final de todas as crises do indivíduo até ser submetido à cirurgia. Este método pode enviesar a interpretação dos resultados obtidos visto que estão a ser extrapolados mecanismos de ação dinâmicos, através de resultados baseados em estudos observacionais, estáticos e indiretos do acumular de uma série de eventos ao longo do tempo. Seria importante para o esclarecimento destas hipóteses o recurso a estudos neurofisiológicos e imunohistoquímicos, que permitissem estudar as projeções da via das fibras musgosas e perceber a real importância e existência do *sprouting* em CA3 e do efeito das sinapses entre CA3 e o *subiculum*. O facto de encontrarmos uma correlação positiva entre o grau de gliose do giro denteado e o *subiculum* reflete que, pelo menos numa fase crónica da patofisiologia da ELT-EMLT, a reação astrocitária da porta de entrada do circuito hipocampal (giro denteado) é acompanhada em paralelo com a da porta de saída (*subiculum*). Uma vez mais, estudos neurofisiológicos ajudariam a perceber a dinâmica deste circuito.

Ficou claro desde as primeiras descrições das alterações anatómicas do lobo temporal que a distribuição das lesões e a variabilidade individual são extremamente vastas. Através de estudos *post mortem* e de modelos animais é consensual que, para além do hipocampo, várias outras áreas cerebrais sofrem os mesmos mecanismos de reação glial e de perda neuronal em doentes com ELT, entre elas, a amígdala, os núcleos talâmicos e o córtex entorrinal [28-30]. Para além disso, estão também descritos alguns casos de patologia extra-hipocampal sem que haja qualquer alteração no hipocampo documentada [31]. Algumas destas áreas não são passíveis ser estudadas, dada a complexidade do procedimento cirúrgico e da incompatibilidade deste com a vida. No entanto, dentro de todas as áreas referidas, parte do córtex entorrinal e a amígdala são, por norma, removidos com a lobectomia temporal anterior e, portanto, passíveis de ser analisadas. Com vista ao estudo dessas descrições, no presente estudo foi também analisado um corte histológico de neocórtex temporal de cada doente, para além das diferentes áreas do hipocampo classicamente estudadas.

Tendo em conta a tabela III, é possível constatar que há um *score* de astrocitose clara nos cortes histológicos de neocórtex e que, ao ser comparada com a área do hipocampo menos atingida (CA2), não é desprezível (tabela III). Estes achados sugerem-nos que o processo reativo astrocitário se estende para além do hipocampo e, neste contexto, sugerir que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na esclerose mesial se possam estender para áreas extra-hipocampais e uma eventual ligação deste facto com a recorrência, ou ausência de resposta das crises pós cirurgia. A ausência de correlação estatisticamente significativa entre o córtex temporal e todas as áreas do hipocampo, pode-nos sugerir uma independência desta área em relação ao hipocampo na patofisiologia da doença. Apesar de uma hipótese teórica, está de acordo com o que vem sido descrito em outros estudos já realizados com metodologias diferentes [28-30,32].

Dado não ter sido encontrada qualquer correlação fisiopatológica descrita entre CA3 e CA4, não nos é possível concluir para além do que o teste estatístico nos permite, ou seja, de que quanto maior a gliose em CA3 maior em CA4, quando aplicado à população em estudo.

Apesar das correlações encontradas entre as diversas estruturas anatómicas, não foi encontrada qualquer correlação com as variáveis clínicas e demográficas, nomeadamente entre o grau de astrocitose e o prognóstico pós cirurgia. Este dado, por um lado, está de acordo com a variabilidade patológica interpessoal descrita desde os primeiros estudos nesta área [1] e, por outro, reforça a ideia deste estudo incidir sobre a leitura estática do estadió terminal de um processo crónico e dinâmico que decorre ao longo de décadas. Neste caso, o tamanho da amostra em estudo é também um fator limitante na obtenção de uma correlação clinicopatológica.

CONCLUSÃO

Com a análise da astrocitose através de GFAP foi possível obter resultados coerentes com o que está descrito noutros trabalhos que tiveram por base metodologias diferentes. Assim, foi possível corroborar que a gliose/astrocitose nos doentes com ELT-EMLT é mais marcada nas sub-regiões GD, CA3, CA4 e, principalmente, CA1 da formação hipocampal, ficando a zona de CA2 relativamente poupada. Para além disso, foi possível inferir que este padrão de

rearranjo celular não é aleatório e que a gênese do foco e a própria propagação da crise parece ter uma distribuição de acordo com aquilo que são as projeções celulares implicadas em funções fisiológicas, como por exemplo, na PLP que permite o armazenamento da memória declarativa. Neste contexto, o rearranjo neuronal da via das fibras musgosas (*sprouting*) toma um papel importante no início ou, pelo menos, na facilitação da epileptogênese.

Com o presente estudo foi possível inferir que, para além do hipocampo, outras áreas podem desenvolver uma reação astrocitária, nomeadamente o neocórtex temporal. Estas alterações podem, eventualmente, ter um papel na patogénese da doença e sugerir que as alterações da ELT se estendem para além da formação hipocampal.

Não se obteve qualquer correlação entre as características neuropatológicas e os dados demográficos estudados, em particular entre o grau de astrocitose e o prognóstico cirúrgico. Estes resultados são similares aos descritos em outros trabalhos [33], e podem sugerir que a patologia da ELT-EMLT é variável, tendo no entanto, uma via final comum nos vários subgrupos clínicos e demográficos. Em todo caso, as limitações metodológicas do nosso estudo também condicionam esta interpretação.

REFERÊNCIAS

1. Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy: Mechanisms of disease. *N Eng J Med*. 2003;**349**(13):1257-66.
2. Benbadis SR. Epileptic Seizures and Syndromes. *Neurol Clin*. 2001;**19**:251-70.
3. Rho JM, Sankar R, Cavazos JE. Epilepsy: Scientific foundations. *N Eng J Med*. 2005;**352**(7):738-739
4. Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol*. 2003;**16**(2):165-170
5. Engel J Jr. Mesial Temporal lobe Epilepsy: what we have learned? *Neuroscientist* 2001;**7**:340-52.
6. Blumcke I. Neuropathology of focal epilepsies: a critical review. *Epilepsy Behav* 2009;**15**:34-39
7. Kuruba R, Hattiangady B, Shetty A. Hippocampal Neurogenesis and Neural Stem Cells in Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Behav* 2009;**14**(1):65-73
8. Thom M, Zhou J, Martinian L, Sisodiya S. Quantitative post-mortem study of the hippocampus on chronic epilepsy: seizures do not inevitably cause neuronal loss. *Brain* 2005;**128**:1344-1357
9. Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. 2001;**345**(5):311-8
10. French JA, Williamson PD, Thadani VM, et al. Characteristics of mesial temporal lobe epilepsy: Results of history and physical examination. *Ann Neurol* 1993; **34**:774.
11. Löscher W. How to Explain Multidrug Resistance in Epilepsy?. *Epilepsy Curr* 2005 **5**(3):107–112
12. Tellez-Zenteno JF, Dhar R, Wiebe S. Long-term seizure outcomes following epilepsy surgery: a systematic review and meta-analysis. *Brain* 2005;**128**:1188-1198
13. Passaro EA, Cavazos JE, Benbadis SR. Outcome of Epilepsy Surgery. 2011

14. Wieser H-G, Engel J, Williamson PD, Babb TL, Gloor P. Surgically remedial temporal lobe syndromes. In: Engel J Jr, editor. Surgical treatment of the epilepsies, New York: Raven Press, 1993: 49-63.
15. Thom M, Martinian L, Catarino C, Yogarajah M, et al. Bilateral reorganization of the dentate gyrus in hippocampal sclerosis. *Neurology* 2009;**73**:1033-1039
16. Scharfman HE, Sollas AL, Berger RE, et al. Electrophysiological Evidence of Monosynaptic Excitatory Transmission between Granule Cells after Seizure-induced Mossy Fiber Sprouting. *J Neurophysiol* 2003;**90**:2536-2547
17. Bonilla L. Automated MRI analysis for identification of hippocampal atrophy in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2009;**50**:228-233
18. Woermann F, Vollmar C. Clinical MRI in children and adults with focal epilepsy: A critical review. *Epilepsy Behav* 2009;**15**:40-49
19. Sommer W. Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1880;**10**:631-635
20. Masukawa LM, Higashima M, Kim JH. Epileptiform discharges evoked in hippocampal brain slices from epileptic patients. *Brain Res* 1989;**493**:168–74
21. Schwartzkroin PA. Hippocampal slices in experimental and human epilepsy. *Adv Neurol* 1986;**44**:991–1010
22. Cavazos JE, Cross D. The Role of Synaptic Reorganization in Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Behav* 2006;**8**(3):483-493
23. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;**361**:31-39
24. Perez Y, Morin F, Beaulieu C. Axonal sprouting of CA1 pyramidal cells in hyperexcitable hippocampal slices of kainate-treated rats. *Eur J Neurosci* 1996;**8**:736–48
25. Staff NP, Jung HY, Thiagarajan T, et al. Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *J Neurophys* 2000;**84**:2398–408

26. Cavazos JE, Jones SM, Cross DJ. Sprouting and Synaptic Reorganization in the Subiculum and CA1 Region of the Hippocampus and Chronic Models of Partial-Onset Epilepsy. *Neuroscience* 2004;**126**(3):677-688
27. Simon R, Cho H, Gwinn R, Lowenstein D. The temporal profile of 72-kDa heat-shock protein expression following global ischemia. *J Neurosci* 1991;**11**:881-889.
28. Hudson LP, Munoz DG, Miller L, McLachlan RS, Girvin JP, Blume WT. Amygdaloid sclerosis in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1993;**33**:622–631.
29. Juhász C, Nagy F, Watson C, da Silva EA, Muzik O, Chugani DC, Shah J, Chugani HT. Glucose and [C-11]flumazenil positron emission tomography abnormalities thalamic nuclei in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 1999;**53**:2037–2045
30. Du F, Whetsell WO, Abou-Khalil B, Blumenkopf B, Lothman EW, Schwarcz R. Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1993;**16**:223–233.
31. Bertram EH. Temporal Lobe Epilepsy: Where do the seizures really begin? *Epilepsy Behav* 2009;**14**(1):32-37
32. Natsume J, Bernasconi N, Andermann F, Bernasconi A. MRI volumetry of the thalamus in temporal, extratemporal, and idiopathic generalized epilepsy. *Neurology*. 2003;**60**:1296–300
33. Cerosimo R, Flesler S, Bartoluci M, e tal. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: study of 42 children. *Seizure*. 2011;**20**:131-137

