

PEDRO PAULO VASCONCELLOS VARELLA

ESTUDO NEUROPATOLÓGICO E NEUROQUÍMICO DA INFLAMAÇÃO NO  
HIPOCAMPO DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL  
ASSOCIADA À ESCLEROSE MESIAL

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências

São Paulo

2009

PEDRO PAULO VASCONCELLOS VARELLA

ESTUDO NEUROPATOLÓGICO E NEUROQUÍMICO DA INFLAMAÇÃO NO  
HIPOCAMPO DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL  
ASSOCIADA À ESCLEROSE MESIAL

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências

**Orientadora:** Prof. Dra. Maria da  
Graça Naffah Mazzacoratti

São Paulo

2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Varella, Pedro Paulo Vasconcellos

**ESTUDO NEUROPATOLÓGICO E NEUROQUÍMICO DA INFLAMAÇÃO  
NO HIPOCAMPO DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO  
TEMPORAL ASSOCIADA À ESCLEROSE MESIAL / Pedro Paulo Vasconcellos  
Varella – São Paulo, 2009**Tese (Doutorado) – Universidade federal de São Paulo –  
Escola Paulista de Medicina.

Título em inglês: Hippocampal hypersignal on MRI is relacionated with IL1,  
TNF, Nitric Oxide and glutamate levels.

Descritores: 1. Citocinas; 2- Epilepsia do Lobo Temporal; 3- Inflamação

Esta tese foi realizada na Disciplina de Neurologia Experimental do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, durante o curso de pós-graduação em Neurociências, com o auxílio financeiro das entidades: CAPES, CNPq, FAPESP, FADA e INNT.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA E NEUROCIRURGIA**

**Chefe do Departamento:** Prof. Dra. Débora Amado Scerni

**Coordenador do Curso de Pós-Graduação:** Prof. Dra. Maria da Graça

Naffah Mazzacoratti

**PEDRO PAULO VASCONCELLOS VARELLA**

**ESTUDO NEUROPATOLÓGICO E NEUROQUÍMICO DA INFLAMAÇÃO NO  
HIPOCAMPO DE PACIENTES COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL  
ASSOCIADA À ESCLEROSE MESIAL**

**Presidente da Banca**

Prof. Dra. Maria da Graça Naffah Mazzacoratti

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Fernando Cendes

Prof. Dra. Vera Cristina Terra

Prof. Dr. Henrique Carrete Jr.

Prof. Dr. Sérgio Rosenberg

**Suplentes**

Prof. Dr. Debora Amado Scerni

Prof. Dr. Américo Sakamoto

Aprovada em: 04 / 08 / 2009

À minha mãe, às minhas tias (Dodó, Dodô e Helena) e ao meu irmão pelo apoio incondicional em todas as minhas empreitadas.

## AGRADECIMENTOS

Dr. Antônio José Lorenzin (Tio Toninho), por ter assumido dois filhos a mais.

Aline Ceolin, pelo amor e compreensão incondicionais.

Prof. Dra. Maria da Graça Naffah Mazzacoratti, por ter aceito um estranho em seu departamento e pela dedicação incansável (acima mesmo da própria saúde) ao departamento e a todos os alunos.

Prof. Dra. Elza Márcia T. Yacubian, pela competência, experiência e apoio indiscutíveis.

Prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro, pelo incentivo sempre presente e sem dúvida motivo de inspiração para todos nós.

Prof. Dr. Fúlvio Alexandre Scorza, pela amizade e incentivo.

Prof. Dra. Débora Amado Scerni, pela amizade e incentivo.

Joselita Ferreira Carvalho Santiago, por ter feito o possível e o impossível por mim; pela amizade incondicional e pelos bons conselhos.

Eduardo Ferreira de Castro Neto, pela amizade e revisão crítica dos primeiros manuscritos.

Dr. Henrique Carrete Jr., pela amizade e pelo apoio nos estudos de imagem.

Dr. Ricardo Centeno da Silva, pela amizade e incentivo.

Dr. Fábio Piccarolo Cerávolo e Dr Adriano Zanon da Silva, pela amizade e boas conversas.

Dr. Renato José Mendonça Natalino e Dra. Sheila, pela amizade e revisão final do manuscrito.

Dr. Raphael S. S. de Medeiros, pela amizade, paciência (que é mútua) e pelas extensas discussões / brigas acadêmicas (sempre durante o horário inadequado).

À toda a equipe do DASA (Delboni Auriemo e CientíficaLab), principalmente ao Dr. Antonio, Dr. Marcelo e ao Dr. Eidi, pela amizade e incentivo sempre presentes.

Ao Sérgio (Seré), Sérgio (Yoda), Daniel (Sam), Contrera, Guidoni, Tatiana, Álvaro, Thais, Daniel (Hideo), Fajardo, pela amizade e apoio durante a faculdade e residência médica.

Gianni M. S. dos Santos, pela análise estatística de todos os resultados.

Profa. Dra. Elisa Mieko Suenitsu Higa, pela análise do óxido nítrico.

e finalmente à Nena, por provar que anjos existem, não avisam quando aparecem e não tem a forma dos contos de fadas.

*"Non raggiungeremo così lontano come quando non avevamo  
nessuna nozione  
da dove possiamo arrivare."*

Cristoforo Colombo

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Classificação esquemática das crises epiléticas.....	<b>5</b>
<b>FIGURA 2:</b> Ressonância nuclear magnética do encéfalo de pacientes.....	<b>18</b>
<b>FIGURA 3:</b> Secções histológicas de cérebro de pacientes com EMT.....	<b>20</b>
<b>FIGURA 4:</b> Secções histológicas de amígdala de pacientes com EMT.....	<b>24</b>
<b>FIGURA 5:</b> Secção histológica da formação hipocampal controle (regiões do <i>Cornu Ammonis</i> ).....	<b>26</b>
<b>FIGURA 6:</b> Representação esquemática da circuitaria do hipocampo e das suas camadas.....	<b>28</b>
<b>FIGURA 7:</b> Secção histológica da formação hipocampal controle (camadas celulares).....	<b>30</b>
<b>FIGURA 8:</b> Secções histológicas de colo uterino e pele (casos de neoplasia com ocorrência de inflamação).....	<b>38</b>
<b>FIGURA 9:</b> Ressonância nuclear magnética do encéfalo com aferição da intensidade do sinal.....	<b>73</b>
<b>FIGURA 10:</b> Classificação de Blumcke dos tipos de esclerose hipocampal.....	<b>78</b>
<b>FIGURA 11:</b> Boxplot com a comparação da Idade (anos) dos indivíduos, segundo grupos.....	<b>83</b>

<b>FIGURA 12:</b> Gráfico da distribuição da classificação de Engel dos pacientes em percentagem.....	<b>84</b>
<b>FIGURA 13:</b> Boxplot com a comparação da concentração de IL1 $\beta$ (em pg/ml) no HPC de pacientes e controles.....	<b>86</b>
<b>FIGURA 14:</b> Boxplot com a comparação da concentração de TNF $\alpha$ (em pg/ml) no HPC de pacientes e controles.....	<b>86</b>
<b>FIGURA 15:</b> Boxplot com a comparação da concentração de NO (em $\mu$ M/mg) no HPC de pacientes e controles.....	<b>87</b>
<b>FIGURA 16:</b> Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal da cabeça do hipocampo comprometido e contralateral.....	<b>88</b>
<b>FIGURA 17:</b> Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal do corpo hipocampal comprometido e contralateral.....	<b>89</b>
<b>FIGURA 18:</b> Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal da cauda do hipocampo comprometido e contra-lateral.....	<b>89</b>
<b>FIGURA 19:</b> Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados de hipersinal da cabeça do hipocampo do lado comprometido e IL1 $\beta$ (em pg/ml).....	<b>91</b>
<b>FIGURA 20:</b> Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal da cabeça do hipocampo do lado comprometido e TNF $\alpha$ (em	

pg/ml).....92

**FIGURA 20:** Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal da cabeça do hipocampo do lado comprometido e TNF $\alpha$  (em pg/ml).....92

**FIGURA 21:** Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados de hipersinal da cabeça do hipocampo do lado comprometido e NO (em  $\mu$ M/mg).....92

**FIGURA 22:** Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal do corpo do hipocampo do lado comprometido e IL1 $\beta$  (em pg/ml).....93

**FIGURA 23:** Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal do corpo hipocampo do lado comprometido e TNF $\alpha$  (em pg/ml).....93

**FIGURA 24:** Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal do corpo do hipocampo do lado comprometido e NO (em  $\mu$ M/mg).....94

**FIGURA 25:** Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal da cauda do hipocampo do lado comprometido e IL1 $\beta$  (em pg/ml).....94

**FIGURA 26:** Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do

hipersinal da cauda do hipocampo do lado comprometido e TNF $\alpha$ (em pg/ml).....	95
<b>FIGURA 26:</b> Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal da cauda do hipocampo do lado comprometido e TNF $\alpha$ (em pg/ml).....	95
<b>FIGURA 27:</b> Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal da cauda do hipocampo do lado comprometido e NO (em $\mu$ M/ml).....	95
<b>FIGURA 28:</b> Boxplot com a comparação entre a concentração de GLU (em ng/mg) em pacientes e controles.....	97
<b>FIGURA 29:</b> Boxplot com a comparação entre a concentração de GABA (em ng/mg) em pacientes e controles.....	97
<b>FIGURA 30:</b> Correlação entre valores normalizados do hipersinal da cabeça do hipocampo do lado comprometido e concentração de GLU.....	99
<b>FIGURA 31:</b> Correlação entre valores normalizados do hipersinal do corpo do hipocampo do lado comprometido e concentração de GLU.....	100
<b>FIGURA 32:</b> Correlação entre valores normalizados do hipersinal da cauda do hipocampo do lado comprometido e concentração de GLU.....	100
<b>FIGURA 33:</b> Secções histológicas de esclerose hipocampal.....	107
<b>FIGURA 34:</b> Imuno-histoquímica (CD45) em secções de hipocampo.....	108

<b>FIGURA 35:</b> Imuno-histoquímica (IL1 $\beta$ ) em secções de hipocampo.....	<b>110</b>
<b>FIGURA 36:</b> Imuno-histoquímica (IL1 $\beta$ ) em secções de hipocampo comparação com controle.....	<b>111</b>
<b>FIGURA 37:</b> Esquema mostrando as conseqüências da inflamação no tecido nervoso.....	<b>135</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características clínicas dos pacientes.....	<b>80</b>
<b>Tabela 2:</b> Grupo controle de autópsia.....	<b>82</b>
<b>Tabela 3:</b> Distribuição dos indivíduos, segundo Gênero e Grupo.....	<b>82</b>
<b>Tabela 4:</b> Distribuição da classificação de Engel dos pacientes.....	<b>84</b>
<b>Tabela 5:</b> Medidas-resumo das concentrações de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ (em pg/ml) e NO (em $\mu$ M/mg), segundo Grupo.....	<b>85</b>
<b>Tabela 6:</b> Coeficientes de correlação linear de Pearson entre os valores da Cabeça, Corpo e Cauda do hipocampo do lado comprometido e o lado contralateral.....	<b>90</b>
<b>Tabela 7:</b> Coeficientes de correlação linear de Pearson entre os valores da cabeça, corpo e cauda do hipocampo do lado comprometido e IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ e NO.....	<b>96</b>
<b>Tabela 8:</b> Medidas-resumo das concentrações de GLU e GABA, segundo Grupo.....	<b>98</b>
<b>Tabela 9:</b> Coeficientes de correlação linear de Pearson entre os valores normalizados de hipersinal da cabeça, corpo e cauda do hipocampo do lado comprometido e Concentração de GLU (em ng/mg).....	<b>101</b>

<b>Tabela 10:</b> Medidas-resumo das concentrações de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , NO, GLU e GABA, segundo a dicotomia entre esclerose hipocampal clássica e atípica.....	<b>102</b>
<b>Tabela 11:</b> Medidas-resumo das concentrações de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , NO, GLU e GABA, segundo a dicotomia entre esclerose hipocampal clássica tipo IB e demais tipos.....	<b>103</b>
<b>Tabela 12:</b> Medidas-resumo das concentrações de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , NO, GLU e GABA, segundo a dicotomia entre diferentes graus de Engel.....	<b>104</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

5HT: Serotonina.

AMPA: Amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxale-4-propionato.

ASP: L-Aspartato.

ATP: Adenosinatrifosfato.

CA: *Cornu Ammonis*

CPC: Crise parcial complexa.

CPS: Crise parcial simples.

DAG: Diacilglicerol.

EH: Esclerose do hipocampo.

ELT: Epilepsia de lobo temporal.

ELTM: Epilepsia de lobo temporal medial (mesial).

EMT: Esclerose mesial temporal.

EEG: Eletrencefalografia.

HSER: Homosserina.

ILAE: *International League Against Epilepsy*.

IP3: Inositoltrifosfato.

GLN: Glutamina.

GLI: Glicina.

GLU: Glutamato.

GABA: Ácido gama-amino-butírico.

HPC: Hipocampo.

IL1 $\beta$ : Interleucina um beta.

KA: Cainato.

LPT: Potenciação duradoura.

MHC: Complexo de histocompatibilidade.

NMDA: N-metil-d-aspartato.

NO: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintetase.

nNOS: Óxido nítrico sintetase neuronal.

eNOS: Óxido nítrico sintetase endotelial.

iNOS: Óxido nítrico sintetase indutível.

OPA: O-oftaldeido.

PAF: Fator ativador de plaquetas.

PGE2: Prostaglandina E2.

pS: pico Siemens.

RM: Ressonância magnética.

RNA: Ácido ribonucléico.

SE: *Status Epilepticus*.

TAU: Taurina.

TNF $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa.

## ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	vii
AGRADECIMENTOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO	
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 EPILEPSIA.....	2
1.2 ANATOMIA PATOLÓGICA E EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL.....	12
1.3 INFLAMAÇÃO.....	36
1.4 EXCITOTOXICIDADE E INFLAMAÇÃO NA EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL.....	44
2.0 OBJETIVOS.....	54
3.0 CASUÍSTICA.....	55
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS.....	56
3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	57
4.0 METODOLOGIA.....	58
4.1 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO.....	58
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISSORES.....	60
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE INTERLEUCINA 1 BETA E FATOR DE NECROSE TUMORAL ALPHA.....	62

4.4 MÉTODOS HISTOLÓGICOS.....	66
4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	68
4.6 CONTROLES.....	70
4.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	71
4.8 ANÁLISE DA IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA.....	71
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
4.10 CLASSIFICAÇÃO DE ENGEL.....	75
4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	77
5.0 RESULTADOS.....	80
5.1 CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS.....	80
5.2 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS E NO NOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE.....	84
5.3 CORRELAÇÃO ENTRE O SINAL OBTIDO NA IRM DO HIPOCAMPO COMPROMETIDO E CONTRA-LATERAL.....	87
5.4 CORRELAÇÃO ENTRE HIPERSINAL DO HIPOCAMPO NA IRM E CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS E NO.....	90
5.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS E NO NOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE.....	96
5.6 CORRELAÇÃO ENTRE INTENSIDADE DE SINAL DO HIPOCAMPO NA IRM E CONCENTRAÇÃO DE GLU.....	98
5.7 RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS, NO, GABA E GLU COM OS TIPOS DE ESCLEROSE DO HIPOCAMPO.....	101

5.8 COMPARAÇÃO DA ESCALA DE ENGEL DOS PACIENTES COM A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS, NO, GABA E GLU.....	103
5.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS CASOS.....	105
6.0 DISCUSSÃO.....	112
6.1 ASPECTOS GERAIS E SOBRE A LATERALIDADE DO PROCESSO.....	112
6.2 EXCITOTOXICIDADE E ELT POR EMT.....	116
6.3 SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	120
6.4 SOBRE A CORRELAÇÃO COM A IRM.....	128
6.5 SOBRE OS PADRÕES DE ESCLEROSE DO HIPOCAMPO.....	136
7.0 CONCLUSÃO.....	138
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
9.0 ABSTRACT.....	159
10.0 ANEXOS.....	161

## Resumo

**Objetivos:** Estudar a existência de correlação linear entre a intensidade do sinal na IRM do hipocampo em FLAIR na ELT com EH e a concentração de GLU, NO, IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . Em outro enfoque, objetivamos comparar as concentrações hipocampais destes mediadores entre os pacientes com ELT e EH e controles obtidos de autópsia. **Metodologia:** Estudamos 29 pacientes com ELT por EH e 20 indivíduos controles (10 autópsia e 10 controles de IRM). O sinal na IRM foi medido em FLAIR (Leonardo, Syngo MR 2004A Siemens Medical Solutions) tanto para pacientes como para controles. As concentrações de GLU foram obtidas por cromatografia líquida (HPLC), a de IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$  foram obtidas por ELISA (Kit BD Opteia) e a de NO foi aferida pelo equipamento NOA™ 280, Sievers Instruments. Os dados foram avaliados utilizando-se os testes t de Student para a comparações de concentrações de mediadores nos diferentes tecidos e o teste exato de Fisher, de Kolmogorov-Smirnov, de Levene para a avaliação da correlação linear de Pearson entre as variáveis. **Resultados:** Quanto avaliamos as concentrações dos diferentes mediadores em tecido com EH e controle observamos aumento da concentração de IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$  e redução do GLU e GABA na EH, sem alterações significativas do NO. Houve correlação linear positiva entre as concentrações de NO, e hipersinal em FLAIR

tanto na cabeça, corpo e cauda do hipocampo. A citocina IL1 $\beta$  mostrou correlação linear positiva com o sinal em FLAIR na cauda hipocampal. Além disso, houve correlação linear inversa entre o sinal de FLAIR e a concentração de GLU no hipocampo de pacientes com EH. **Conclusão:** Esses dados sugerem haver correlação entre liberação de GLU e intensidade de sinal em FLAIR na IRM. Por outro lado a correlação positiva entre NO e IL1 $\beta$  e sinal em FLAIR também sugere associação com o fenômeno inflamatório e quantidade de água no hipocampo. Desta forma, concluímos que na EH há inflamação e excitotoxicidade, mesmo nas fases crônicas da síndrome, flagradas pelas alterações das concentrações de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e GLU e NO. Estas alterações podem estar correlacionadas com o hipersinal da IRM em FLAIR.

## 1.0 INTRODUÇÃO

A epilepsia é um dos distúrbios mais antigos que afligem a humanidade. As descrições remontam à 3500 aC, escritas pelos sumérios e egípcios. Entretanto, o principal e mais antigo documento que trata de neurologia é egípcio, datando de 1700 aC. É denominado papiro de Smith e neste documento é usado pela primeira vez o termo encéfalo e trata de possíveis convulsões, oriundas de ferimentos no segmento cefálico de trabalhadores (Breasted, 1930).

Nessa mesma época, muitos textos escritos em acadiano registram crises epilépticas. Neste período, apesar da aparente lucidez dos egípcios relacionando a epilepsia com traumas e com o encéfalo, as idéias predominantes sobre a epilepsia e demais doenças eram oriundas de fenômenos sobrenaturais, magias, maldições e maus espíritos (Fitzgerard, 2000). Cumpre ressaltar que já era observado neste período o encurtamento do tempo de vida devido à exposição a substâncias tóxicas, dentre estas estão os asbestos, compostos muito perigosos e usados até o presente (Law, 2009).

Apenas no século VI aC a medicina grega avançou em conhecimento no que tange às doenças. Por volta de 400 aC, foi creditada a Hipócrates a idéia de que a causa da epilepsia não estava no sobrenatural e sim no cérebro (Yacubian, 2000). Desta forma, os gregos foram os primeiros a atribuir causas físicas para as doenças e entre estas, as afecções neurológicas. Foram também os primeiros a

identificar o cérebro como local onde se encontra o comportamento humano (Kandel et al., 2002).

Já os gregos foram um dos primeiros povos com cultura antropocêntrica, que atribuía aos deuses a forma humana. Esses deuses apresentavam os defeitos e qualidades inerentes ao ser humano e deriva da escola Aristotélica a idéia que “todos os animais percebem; porém, só o homem compreende”. Assim, inicia-se o estudo detalhado das doenças e a procura por explicações racionais, mesmo que equivocadas para as diferentes indagações no campo da medicina. Ainda hoje, o diagnóstico das epilepsias é eminentemente clínico e baseia-se na história do paciente, sendo confirmada através de exames subsidiários.

Muitas personalidades marcantes na história da humanidade tinham epilepsia e, devido a sua presença, prevalência e importância as crises foram descritas inclusive na Bíblia, em várias citações como em Mateus 17: 14-18; Marcos 9: 17-27 e Lucas 9: 38-42.

## **1.1 EPILEPSIA**

O termo epilepsia deriva do grego (επιληψια) que significa surpresa, ser apanhado de repente e é definido como um distúrbio cerebral crônico, caracterizado por interrupções espontâneas, episódicas e recorrentes do funcionamento normal do cérebro. Esses eventos são denominados de crises

epilépticas (Engel, 1996). A epilepsia é caracterizada por períodos ictais (crises) e períodos interictais (intercríticos), não constituindo um único distúrbio e sim um grande número destes, abrangendo um vasto número de sintomas, com prognóstico clínico variável, dependendo, dentre outros fatores, da sua etiologia (Engel, 2001b; Foldvary et al., 2001). Por síndrome epiléptica compreendemos a reunião de sinais e sintomas que definem uma condição epiléptica única.

Muitas vezes a crise é precedida por uma aura que do grego significa brisa. Tal nome foi cunhado por Pelops, professor de Galeno, que ao perguntar a um paciente epiléptico o que sentira durante a crise, o paciente não soube responder. Entretanto, um amigo que presenciara o fato referiu que foi como se uma “brisa” houvesse passado por ele (referindo-se ao olhar de surpresa e a expressão facial que com freqüência está presente no início das crises) (Yacubian, 2000).

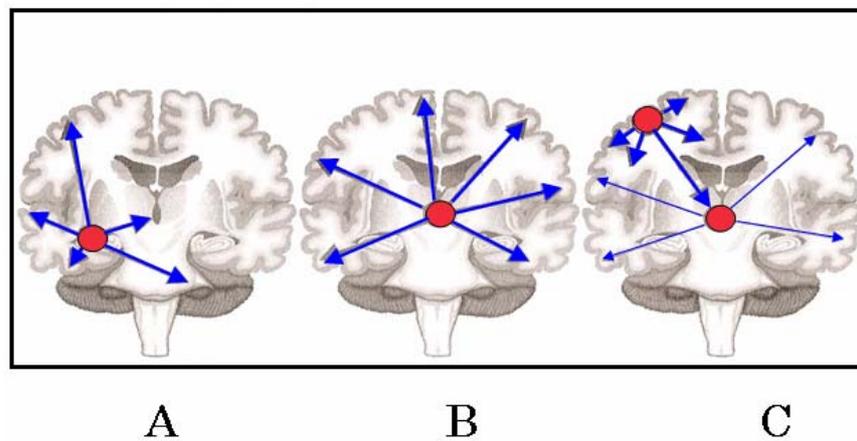
O conceito de que a sintomatologia da epilepsia era devida a descargas neuronais anômalas foi creditado ao neurologista inglês Jackson, no século XIX (Jackson, 1880). O quadro clínico é decorrente dessas descargas neuronais anômalas, sincronizadas, que por sua vez refletem uma alteração do equilíbrio excitatório/inibitório no sistema nervoso ou refletem conexões neuronais anormais (Kandel et al., 2002).

Em 1981 (ILAE, 1981) a International League Against Epilepsy (ILAE) classificou as **crises epilépticas** em três subtipos:

1. Crises Parciais Simples (CPS): Fenômeno epiléptico o qual se origina em determinada área cerebral sem o comprometimento do estado de consciência.

2. Crises Parciais Complexas (CPC): Fenômeno epiléptico que tem origem em uma determinada área cerebral, com comprometimento da consciência. Muitas vezes cursam com automatismos.

3. Crises Generalizadas: Fenômeno epiléptico que acontece de maneira difusa no cérebro sem evidências de localização. Podem ser generalizadas *d'emblée* (primariamente) ou podem ser secundariamente generalizadas, surgindo como a progressão de uma CPS e/ou CPC. **FIGURA 1**



**Figura 1:** A) Descargas epileptiformes envolvendo uma área cortical originam crises parciais ou focais. B) Descargas epileptiformes envolvendo o sistema reticular originam crises generalizadas. C) descargas iniciadas em áreas corticais em sua propagação podem envolver o sistema reticular, dando origem às crises parciais ou focais secundariamente generalizadas. Figura modificada de Yacubian e Garzon (Yacubian and Garzon, 2003).

Porém, em 2001 a ILAE publicou uma nova proposta de classificação das **crises epiléticas** (Engel, 2001b), devido ao aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico. Paradoxalmente esta é uma classificação que se baseia nas características clínicas e semiológicas, deixando de apresentar qualquer conotação anatômica ou fisiopatológica. Compreende três tipos de crises:

1. Crises autolimitadas ou isoladas.

- Crises focais.
- Crises generalizadas.

2. Crises contínuas.

- *Status epilepticus* generalizado.
- *Status epilepticus* focal.

3. Crises reflexas desencadeadas por fatores precipitantes.

As crises focais são aquelas cujas manifestações clínicas indicam o envolvimento de uma área de um dos hemisférios cerebrais e podem, com a propagação das descargas, evoluir para crises parciais complexas e/ou tônico-clônicas generalizadas. Chamando-se crise focal com generalização secundária.

As crises generalizadas não apresentam evidência de início localizado. As manifestações clínicas indicam o envolvimento de ambos os hemisférios cerebrais desde o início e as descargas eletrencefalográficas são bilaterais. A consciência quase sempre é comprometida, exceto nas crises mioclônicas, que são eventos

epilépticos generalizados muito breves, com duração de poucos segundos, quando a consciência é provavelmente preservada.

O *Status Epilepticus (SE)* pode ser definido como a atividade epiléptica contínua e persistente, podendo ser generalizado ou focal. É encontrado em 28% dos pacientes com displasia focal, quando a análise se restringe às formas de distúrbios do desenvolvimento cortical localizado, caracterizado pela presença de neurônios displásicos e células em balão (Palmini et al., 1991). Em contraste, pacientes com tumores cerebrais apresentam baixa frequência de SE (3% a 4%) (Leppik, 1986), confirmando assim o alto grau de epileptogenicidade das lesões displásicas.

As crises reflexas nas síndromes epilépticas focais são evocadas de forma consistente por estímulo aferente ou por um estímulo específico. O estímulo aferente pode ser elementar (auditivo, visual) ou complexo. A atividade também pode ser elementar do tipo motora (movimento) ou elaborada como as cognitivas (leitura, jogos) ou ambas.

Em 1989 a classificação da ILAE (ILAE, 1989) para as síndromes epilépticas relacionava as mesmas como sendo localizadas, generalizadas e indeterminadas. As duas primeiras são evidentemente mais comuns. Essa classificação baseou-se na separação das diferentes epilepsias e síndromes epilépticas em três características principais: tipos de crises (parciais ou

generalizadas), etiologia (sintomáticas, idiopáticas e criptogênicas) e a idade de início das crises. Esta classificação considerava quatro grupos de epilepsias:

1. Epilepsias e síndromes relacionadas à localização, sendo parciais ou focais:

- Idiopáticas: aquelas sem substrato lesional anatômico, provavelmente relacionadas à predisposição genética.

- Sintomáticas: as crises representam um sintoma de uma lesão estrutural do sistema nervoso.

- Criptogênicas: termo que significa que a etiologia da epilepsia é desconhecida ou indeterminada através dos métodos de diagnóstico, atualmente disponíveis. Porém, há dados que sugerem que as mesmas são provavelmente relacionadas a um substrato anatômico alterado.

2. Epilepsias e síndromes generalizadas:

- Idiopáticas.

- Criptogênicas.

- Etiologias não específicas.

- Etiologias específicas.

3. Epilepsias e síndromes indeterminadas focais ou generalizadas:

- Com sinais e sintomas de crises generalizadas e focais.

- Sem sinais inequívocos de crises generalizadas ou focais.

#### 4. Síndromes especiais:

- Crises relacionadas a situações, como por exemplo: estímulos visuais, pensamento, música, alimentação, praxia, estímulos sensitivo-sensoriais, estímulos proprioceptivos, leitura, água quente, sobressalto.

Cumprido ressaltar que as epilepsias relacionadas à localização são aquelas cujas manifestações clínicas indicam o envolvimento de uma parte de um dos hemisférios cerebrais e que as epilepsias generalizadas são aquelas que cursam com crises generalizadas (onde as primeiras manifestações indicam o envolvimento bilateral dos hemisférios cerebrais, muitas vezes confirmadas pelo padrão eletrencefalográfico ictal).

Já as epilepsias sintomáticas agregam as epilepsias que são secundárias a uma doença subjacente, que cursa com crises epilépticas, enquanto que as epilepsias idiopáticas não apresentam uma etiologia definida. Notadamente a idade de início das crises é um fator cardinal na diferenciação destes tipos de epilepsias, uma vez que as epilepsias idiopáticas aparecem predominantemente na infância e adolescência, enquanto as epilepsias sintomáticas têm grande incidência e prevalência nos primeiros anos de vida e também uma incidência e prevalência progressiva a partir da adolescência.

Em 2001, a ILAE na sua nova proposição (Engel, 2001a, b), o termo focal substituiu os termos *parcial e relacionado à localização*, na Classificação de 1989. Estabeleceram-se então os conceitos de que uma síndrome epiléptica

compreende vários sinais e sintomas, que definem uma condição epiléptica única, que pode apresentar etiologias diferentes.

As doenças epiléticas são condições patológicas que apresentam etiologia única e bem definida. Quando, por exemplo, uma síndrome epiléptica tem seu gene reconhecido, transforma-se numa doença epiléptica. Nela figuram as epilepsias idiopáticas, ou seja, aquelas com predisposição genética e as epilepsias sintomáticas ou provavelmente sintomáticas, ou seja, as relacionadas às lesões estruturais, que agora estão subdivididas em epilepsias límbicas e neocorticais, sendo que as epilepsias límbicas compreendem:

- Epilepsia Mesial do Lobo Temporal, com Esclerose Hipocampal (que será objeto deste estudo);
- Epilepsia Mesial do Lobo Temporal, definida por Etiologias específicas;
- Outros tipos definidos segundo a localização e etiologia.

O novo conceito de epilepsia sintomática substituiu o termo criptogênico da classificação de 1989. Todas as formas de epilepsia reflexas, tanto focais como generalizadas, aparecem agrupadas. O conceito das encefalopatias epiléticas é representado por formas de epilepsia que se instalam em geral em crianças previamente normais e que cursam com deterioração cognitiva e déficits neurológicos progressivos.

Finalmente, foram agrupados fenômenos epiléticos que não obrigam o diagnóstico de epilepsia tais como as crises febris, as crises neonatais benignas,

as crises reflexas, as crises de retirada do álcool, outras crises induzidas por drogas ou substâncias químicas e as crises pós-traumáticas imediatas ou precoces.

As epilepsias focais sintomáticas, ou possivelmente sintomáticas, se caracterizam pelo início focal das crises e por apresentar etiologias e manifestações clínicas diversas, variabilidade esta que depende da localização da área epileptogênica. O lobo temporal é o mais epileptogênico das regiões cerebrais, especialmente a porção mesial (límbica).

Nos países desenvolvidos estima-se que entre 0,5% e 1% da população tenha epilepsia. Estes números tendem a serem maiores quando se fala em países subdesenvolvidos, segundo a Organização Mundial da Saúde. Nestes há um maior contingente de infecções e infestações do sistema nervoso central, déficit nutricional e principalmente deficiência da assistência pré-natal. No Brasil, em um estudo realizado na cidade de São José do Rio Preto, a taxa de prevalência de epilepsia foi de 18,6 casos por 1000 habitantes (Borges et al., 2004).

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia focal em adultos, responsabilizando-se por, pelo menos, 40% de todos os casos, (Gastaut et al., 1975; Regesta and Tanganelli, 1999). A ELT pode ser secundária a esclerose mesial temporal ou definida por etiologias definidas como tumores e malformações.

## 1.2 ANATOMIA PATOLÓGICA E EPILEPSIA TEMPORAL

A anatomia patológica é o ramo da medicina que estuda as alterações morfológicas subjacentes ao processo de mórbido. Etimologicamente o termo patologia, muitas vezes usado como sinônimo de anatomia patológica é proveniente do grego (pathos – sofrimento, logus – estudo) (Michalany, 1995). Assim, as doenças podem ser divididas em dois grandes grupos: as que possuem substrato anatomopatológico e as que não o possuem.

O estudo comparativo morfológico é a base da patologia, muitas vezes possibilitando conclusões provadas muito posteriormente pelos outros ramos da medicina (Michalany, 1995). Esta ciência versa basicamente sobre o estudo das lesões, ou seja, sobre as alterações daquilo que consideramos como normal. O reconhecimento do que é normal não é simples, pois além das variações anatômicas inerentes a cada ser humano ocorrem pequenas variações histológicas, topográficas e mesmo fisiológicas que são compatíveis com o padrão “normal”.

Em contrapartida, algumas doenças em estado inicial se confundem com as variações acima mencionadas, tornando nebuloso o limite entre onde termina a saúde e se inicia a doença. Coube a Rudolf Virchow no século XIX reconhecer que as doenças são uma variação da fisiologia normal e não decorrentes somente dos estímulos externos (Virchow, 1854).

No que tange ao estudo morfológico das alterações subjacentes a epilepsia podemos dividi-las em dois grandes grupos:

- Primárias ou sem alterações morfológicas demonstráveis.

- Secundárias a uma alteração morfológica demonstrável (p. ex. neoplasias e cistos).

Desta forma, depreende-se que o achado isolado da anatomia patológica é insuficiente para a explicação das alterações clínicas apresentadas pelos pacientes com epilepsia, levantando a hipótese de que para o desenvolvimento deste distúrbio seria necessário um solo propício (um paciente com tendência a crises epilépticas devido a pequenas alterações constitucionais não demonstráveis pelos métodos atuais), aliado a um evento iniciador ou desencadeante (Les Neurologues du Groupe Pitié-Salpêtrière, 2000). Após isto é necessário que se estabeleçam conexões em que se crie uma via ou circuito “epiléptico” auto-alimentado, que culminará com as manifestações clínicas (Nadler, 2003).

Secundariamente a uma alteração regional, estabelece-se uma anomalia global, pouco demonstrável morfológicamente. Porém, com o estudo detalhado, retrospectivo e prospectivo de cada caso pode-se agrupar os diferentes pacientes em categorias prognósticas.

As epilepsias secundárias usualmente são resistentes ao tratamento clínico, sendo freqüentemente submetidas à cirurgia (Engel et al., 1997). Entretanto, não há uma correlação exata entre os achados morfológicos e a clínica

exibida pelos pacientes. Ou seja, não são todas as neoplasias de um referido tipo que cursam com um mesmo padrão de convulsões ou mesmo com convulsões (Burguer and Scheithauer, 2007; Louis et al., 2007). Além do que, os achados subjacentes à epilepsia, encontrados em alguns pacientes tais como a esclerose mesial temporal (detalhada a seguir), podem estar presentes em outros pacientes, que exibem uma clínica completamente diferente (ex. demência ou distúrbio circulatório cerebral) (Amador-Ortiz et al., 2007; Kalimo, 2005).

Assim, o estudo pormenorizado do produto cirúrgico das epilepsias fármaco-resistentes (refratárias) é primordial tanto no que diz respeito à assistência de cada paciente, quanto para uma melhor compreensão destas doenças, possibilitando assim a estratificação por diferentes critérios em categorias prognósticas.

A ELT representa 60% das epilepsias parciais e 40% das epilepsias em adultos, sendo considerada a forma mais comum nesta faixa etária. (Gastaut et al., 1975; Regesta and Tanganelli, 1999). A atividade das crises na ELT envolve o lobo temporal medial e estruturas límbicas, onde podemos incluir: hipocampo, amígdala, córtex entorrinal, neocórtex temporal lateral, tálamo medial e lobo frontal inferior (Spencer, 2002a, b). Vários estudos têm apontado o hipocampo como sendo uma estrutura particularmente importante na conexão temporal/límbica associada à ELT (de Lanerolle and Lee, 2005). Atualmente, a ELT está subdividida em mesial, neocortical ou lateral, dependendo da origem e semiologia

das crises (Engel, 2001a, b). A ELT mesial (ELTM) pode ser secundária a esclerose mesial temporal ou definida por etiologias tumorais e mal formativas (Cendes and Kobayashi, 2000).

A ELT associada à esclerose mesial temporal é hoje a síndrome epiléptica mais detalhadamente estudada, tanto no âmbito clínico quanto no experimental, devido a sua alta prevalência e a refratariedade ao tratamento farmacológico (Cendes and Kobayashi, 2000).

Na maioria dos pacientes as características clínicas consistem em uma seqüência de eventos relativamente constante (French et al., 1993):

1. Até cerca de 90% dos pacientes referem, em pelo menos algumas crises, fenômeno sensorial consciente (aura).
2. Reação de parada e fixação do olhar.
3. Seguem-se automatismos simples, geralmente do tipo oro-alimentar, e alterações motoras contralaterais; e finalmente,
4. Ocorrem automatismos complexos, súbitos, de aparência agitada ou generalização secundária.

A fase pós-ictal inclui desorientação, déficit de memória recente, amnésia do evento e afasia, se as crises começam no hemisfério dominante (Engel, 1996).

Na avaliação clínica, os pacientes normalmente apresentam exame neurológico normal, exceto nos caso de refratariedade quando os pacientes podem ter déficit de memória recente, disfunção da memória verbal ou não-verbal

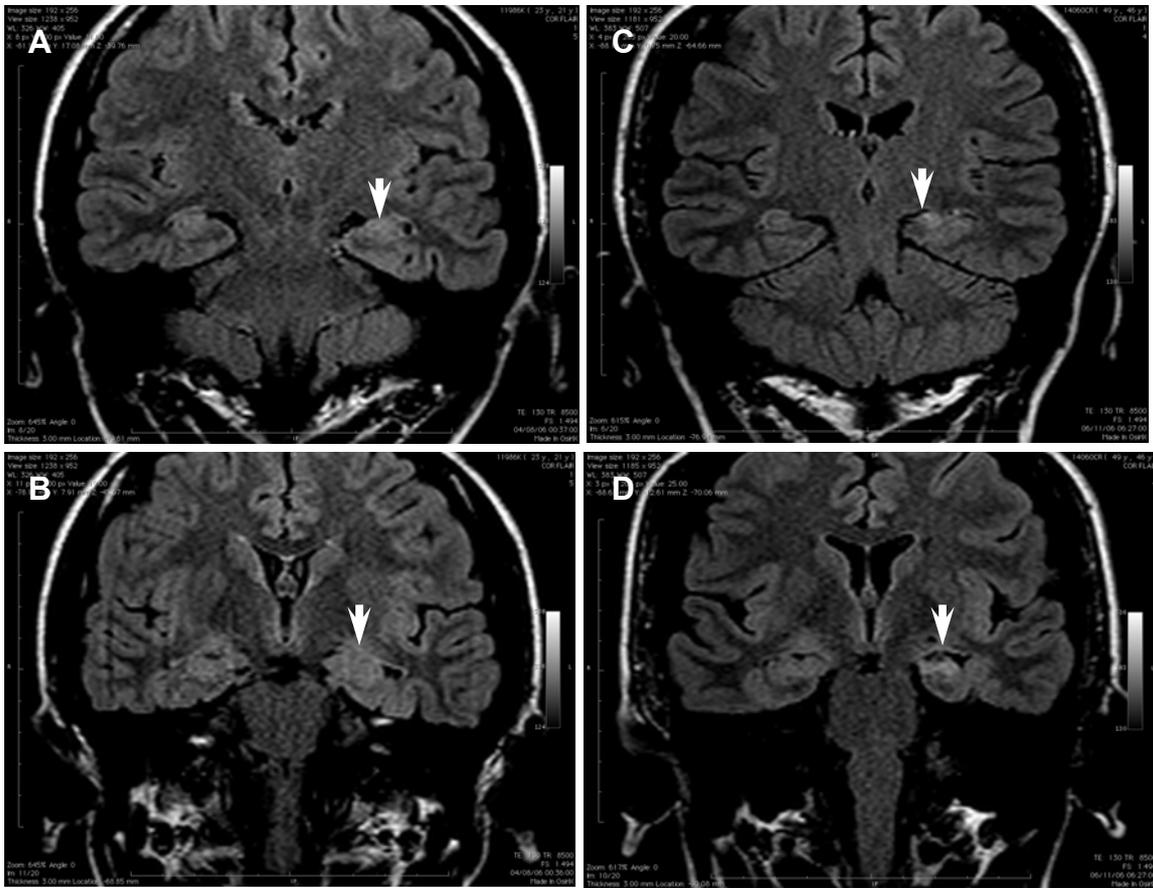
(espacial) e distúrbios cognitivos, de acordo com o lado comprometido (Jones-Gotman, 1991; Jones-Gotman and Smith, 2006).

O diagnóstico por imagem, uma área recente e de grande crescimento, apresenta cada vez mais um papel de destaque no diagnóstico das diferentes síndromes epiléticas. Na EH a RM tem grande sensibilidade no diagnóstico, porém baixa especificidade (Souza et al., 2006). Por ser uma modalidade diagnóstica não-invasiva e com poucas contra-indicações, além do baixo risco para os pacientes tem grande aplicabilidade. Muitas seqüências são usadas para a avaliação dos pacientes com epilepsia do lobo temporal. As seqüências T1, T2, FLAIR e IR representam o segmento de análise qualitativa (na maioria dos casos) e a relaxometria em T2, a espectroscopia e a volumetria representam as seqüências com análises quantitativas.

As imagens obtidas em T1 mostram-se mais anatômicas que as obtidas em T2. A subtração da água livre de T1 na aquisição de T2 gera o FLAIR (fluid-attenuated inversion-recovery). Estas técnicas, quando associadas a análise quantitativa, otimizam o diagnóstico da ELT por EH (EMT), com sensibilidade e especificidade acima de 90% (Sanchez-Alvarez et al., 2000).

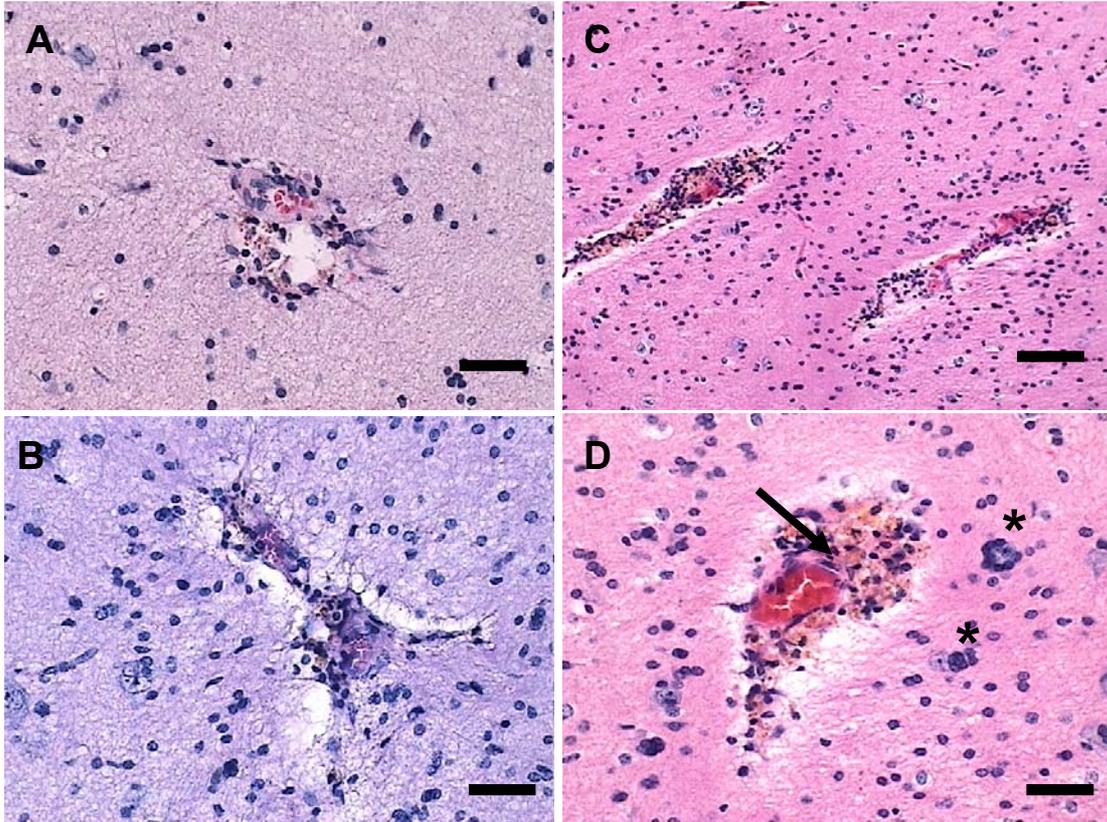
Entretanto, não existe apenas uma alteração que caracterize a EMT na RM, mas sim um grupo de alterações, algumas das quais ainda alvo de discussão quanto a sua gênese. O hipocampo mostra-se atrófico (com volume reduzido) e apresenta hipersinal (flagrado preferencialmente em T2 e em FLAIR), associando-

se dilatação secundária do corno temporal do ventrículo lateral e atrofia do fórnice. Associando-se a estas alterações temos ainda hipersinal na amígdala e também redução do seu volume. O córtex temporal polar (pólo temporal) também freqüentemente apresenta hipersinal e o limite entre as substâncias branca e cinzenta não é nítido. Por vezes o sinal do córtex temporal lateral também se apresenta com sinal alterado (Carrete et al., 2007). **FIGURA 2**



**FIGURA 2:** Exemplos de RM de pacientes com ELT por EMT. **A)** Paciente 28, RM em FLAIR mostrando hipersinal no hipocampo esquerdo. **B)** Paciente 28, RM em FLAIR mostrando hipersinal no hipocampo esquerdo. **C)** Paciente 10, RM em FLAIR mostrando hipersinal no hipocampo esquerdo. **D)** Paciente 10, RM em FLAIR mostrando hipersinal no hipocampo esquerdo. (Setas brancas)

O substrato de muitas destas alterações é motivo de discussão e poucos estudos correlacionam os dados de RM com a histologia. Porém, alguns autores chamam a atenção para a alteração/quebra da bainha de mielina, presença de infiltrado perivascular de linfócitos, proeminência dos espaços perivasculares de Virchow-Robin, além de “clusters” de células “*oligo-like*” (Burguer and Scheithauer, 2007; Mitchell et al., 1999). **FIGURA 3**



**FIGURA 3:** **A)** Infiltrado perivascular de elementos mononucleados constituídos por linfócitos e hemossiderófagos (Barra: 20  $\mu$ m; Hematoxilina&Eosina). **B)** Infiltrado perivascular de elementos mononucleados constituídos por linfócitos e hemossiderófagos, associados à edema / disrupção da mielina perivascular (Barra: 20  $\mu$ m; Cresil). **C)** Infiltrado perivascular de elementos mononucleados constituídos por linfócitos (Barra 20  $\mu$ m; Hematoxilina&Eosina). **D)** Infiltrado perivascular de elementos mononucleados constituídos por linfócitos e hemossiderófagos (seta), associados à edema / disrupção da mielina perivascular e presença de agregados de celular “oligo-like” peri-neurais e solitárias (asteriscos) (Barra: 20  $\mu$ m; Hematoxilina&Eosina).

Na RM geralmente há alterações sugestivas de esclerose mesial temporal representadas pela atrofia e alteração do sinal, em seqüências específicas (Cendes et al., 1993a; Watson et al., 1997a; Watson et al., 1997b) e no SPECT (tomografia computadorizada por emissão de fóton único) observa-se uma redução do fluxo sanguíneo/metabolismo de glicose no período interictal e um aumento dramático do metabolismo durante as crises espontâneas e recorrentes (Duncan et al., 1993; Lee et al., 1988; Rowe et al., 1989) Historicamente, Bouchet e Cazauviehl em 1825 (Bouchet and Cazauviehl, 1825) foram os primeiros autores a referirem as lesões estruturas mesiais do lobo temporal, descrevendo assim a atrofia e a rigidez hipocampal em pacientes epiléticos. Entretanto, a caracterização clínica das crises epiléticas, originadas do lobo temporal, data de 1888, quando Jackson descreveu auras intelectuais e estados oníricos, em pacientes que apresentavam alterações patológicas do rinencéfalo (Jackson, 1888).

Em 1941, Penfield e Erickson (Beaumanoir and Roger, 2001), a partir de estudos eletrofisiológicos realizados durante procedimentos cirúrgicos, introduziram o termo ELT para o quadro que se caracterizava por crises epiléticas com automatismos e ocorrência, no EEG, de espículas e ondas lentas, localizadas na região temporal. Em torno de 1950, estudos clínicos e experimentais descreveram o lobo temporal límbico, funcionalmente distinto das estruturas neocorticais temporais (Penfield, 1958; Penfield and Milner, 1958). As

crises epilépticas límbicas receberam, então, várias denominações como psicomotoras, temporais, focais com expressão difusa, rinencefálicas, antes de serem classificadas como crises parciais complexas. Em 1951, Sholz (Beaumanoir and Roger, 2001) considerou a possibilidade desta forma de epilepsia ser devida a crises epilépticas de repetição, ocorridas durante a infância.

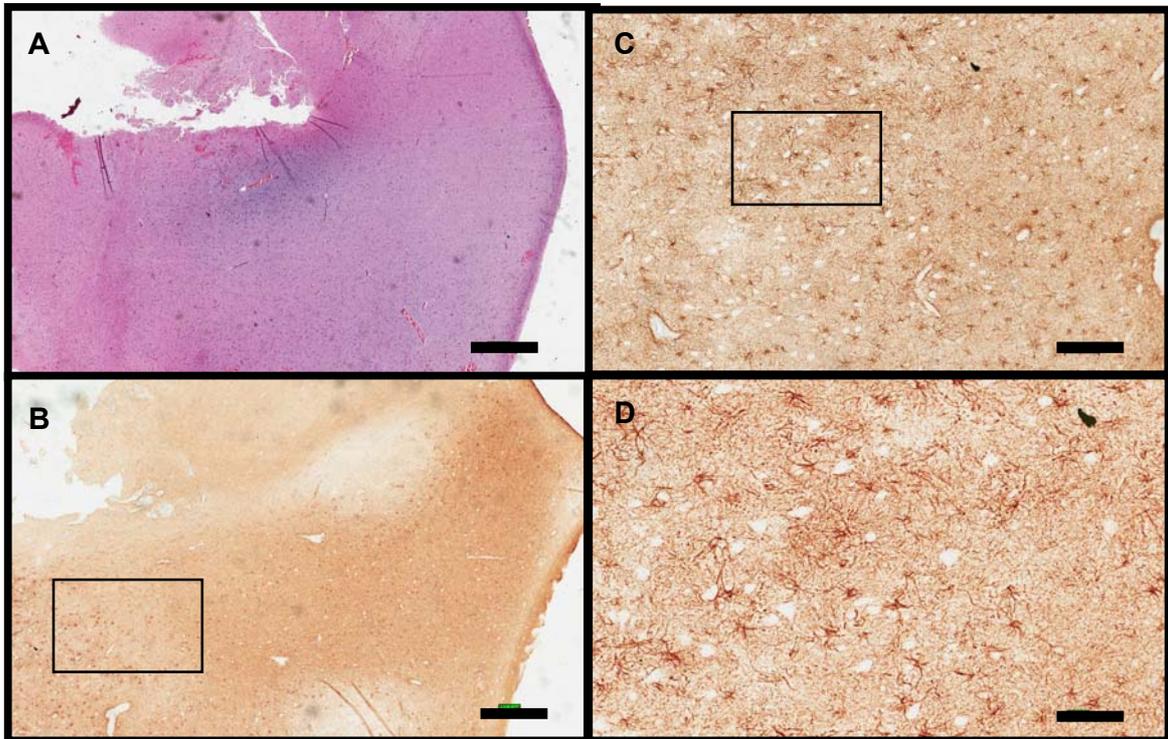
A ELT também pode ser consequência de alterações cerebrais associadas a diferentes fatores, tais como doenças clínicas, doenças neurológicas agudas, lesões cerebrais, tumores, malformações e mais freqüentemente por esclerose mesial temporal / esclerose hipocampal (EMT/EH).

A ELT por EH corresponde a aproximadamente 60% dos casos de ELT (Engel et al., 1997; Sander, 1993). A sua importância clínica reside na sua alta prevalência e elevada proporção de pacientes com crises refratárias ao tratamento medicamentoso. Quanto à estimativa da refratariedade neste tipo de epilepsia há uma variação de 11% a 42% no que tange ao controle das crises (Berkovic et al., 1995; Engel et al., 1993; Patrick et al., 1995; Stephen et al., 2001).

Entretanto a ELT por EMT/EH passou a ser encarada como um distúrbio das conexões neuronais, causado por interações anormais entre as estruturas do lobo temporal (Spencer, 2002a). Em alguns casos pode ter origem no lobo temporal e, conseqüentemente ser tratada pela remoção das estruturas mesiais do lobo temporal (Spencer, 2002b).

A EMT é a lesão mais comumente encontrada na ELT. Deve seu nome devido ao aspecto macroscópico de atrofia e endurecimento das estruturas mesiais do lobo temporal. O termo esclerose origina-se do latim *esclerosis*, cuja tradução grega é *schirro*, cujo significado é duro (Michalany, 1995). Estas alterações foram, pela primeira vez, referidas na epilepsia, associada à perda cognitiva (Bouchet and Cazauviehl, 1825) e seu padrão microscópico descrito anos depois, quando se cunhou a idéia de que “os sintomas epilépticos são freqüentemente associados a uma doença do corno de Ammon” (Sommer, 1880).

Os termos EMT e EH muitas vezes usados como sinônimos fazem menção ao comprometimento das estruturas mesias do lobo temporal e do hipocampo propriamente dito, respectivamente. O termo EMT é mais abrangente, sendo uma designação preferível. **FIGURA 4**



**FIGURA 4:** Alterações na amígdala presentes na EMT. **A)** Secção de amígdala retirada cirurgicamente do Paciente 6 (Barra 1000  $\mu\text{m}$ ; Hematoxilina&Eosina). **B)** Secção de amígdala, representada em “A”, em imuno-histoquímica para GFAP, mostrando gliose focal (Barra 1000  $\mu\text{m}$ ; GFAP). **C)** Ampliação da área marcada em “B”, mostrando hipertrofia e hiperplasia dos astrócitos (Barra 500  $\mu\text{m}$ ; GFAP); **D)** Ampliação da área marcada em “C”, mostrando detalhes dos astrócitos, hiperplásicos, alguns com clasmotodendrose e imagens negativas de neurônios (Barra 100  $\mu\text{m}$ ; GFAP).

A ILAE classificou a ELT entre as relacionadas à localização, enfatizando suas características clínicas, radiológicas e anatômicas específicas e nela, o hipocampo tem sido considerado como uma das estruturas mais comprometidas.

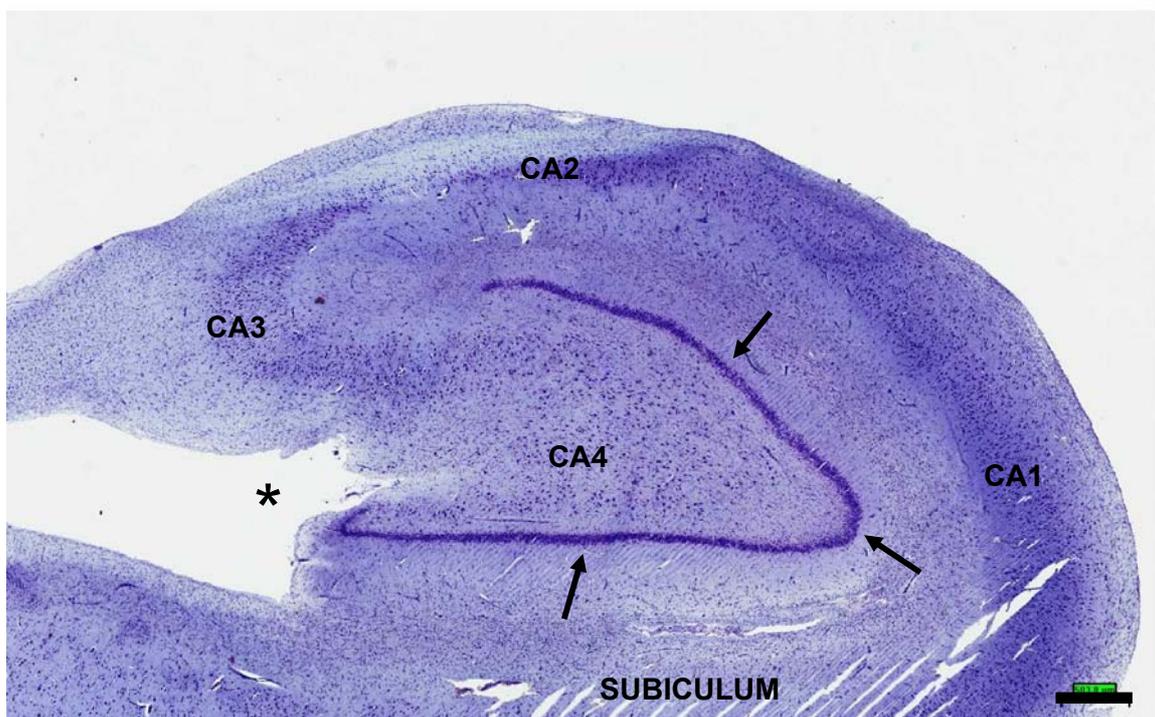
A formação hipocampal é constituída pelo hipocampo propriamente dito (referido também como corno de Ammon, devido à semelhança ao Deus egípcio homônimo), pelo giro dentado e pelo subículo. É um tipo de córtex filogeneticamente muito antigo e conhecido como arquicórtex e é trilaminar. Os setores hipocampais recebem nomes referentes às diferentes regiões (Mills, 2006):

- Cornu Ammonis 1 (CA1): É a porção que se arqueia em direção ao corno temporal do ventrículo lateral, partindo do subiculum, também conhecido como setor de Sommer.

- Cornu Ammonis 2 (CA2): É a porção que constitui o soalho do corno temporal do ventrículo lateral, também conhecido como placa resistente dorsal de Spielmeyer e se caracteriza por ter as células mais próximas (densidade celular maior).

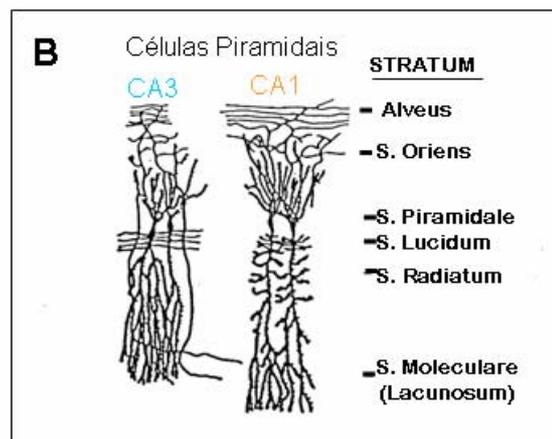
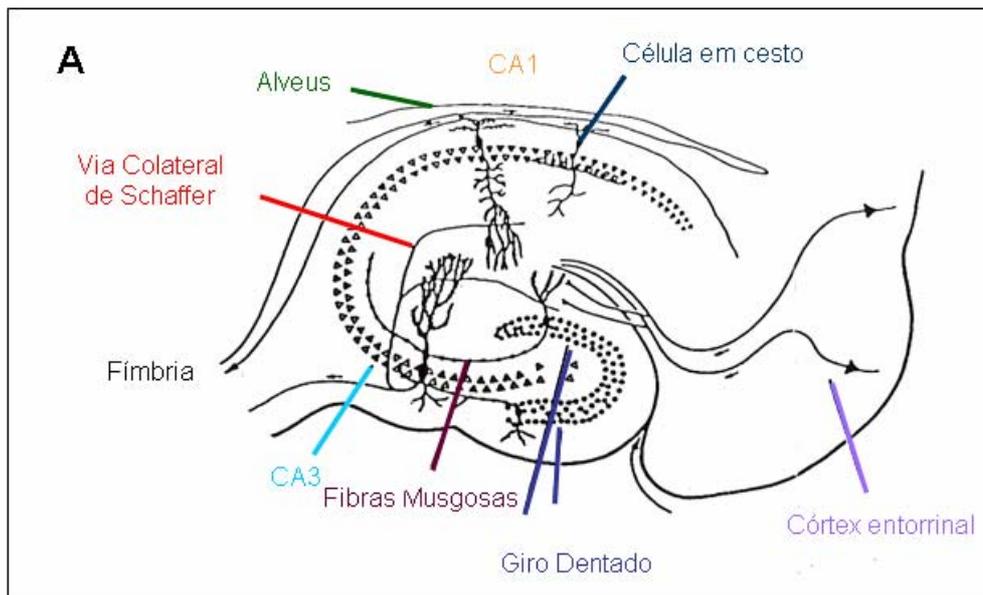
- Cornu Ammonis 3 (CA3): É a porção que sofre deflexão em direção ao hilo do giro dentado.

- Cornu Ammonis 4 (CA4): É constituído pelas células piramidais do hilo do giro dentado. **FIGURA 5**



**FIGURA 5:** Secção histológica da formação hipocámpal onde **CA1** - Cornu Ammonis 1; **CA2** - Cornu Ammonis 2; **CA3** - Cornu Ammonis 3; **CA4** - Cornu Ammonis 4 ou hilo do giro dentado; \* - fissura hipocámpal; Setas – *Stratum granulosum* do giro dentado (Barra 600 µm; Cresil).

O arquicórtex tem apenas um sentido de passagem do impulso nervoso. Este é proveniente do córtex entorrinal (paleocórtex, caracterizado por três ou quatro camadas celulares pouco individualizáveis), que adentra ao *stratum granulosum* do giro dentado pela via perfurante. Através das fibras musgosas que emanam das células granulares este impulso chega ao hipocampo propriamente dito. Pela via das colaterais de Schaffer estas passam de CA3 para CA1 (Kandel et al., 2002). **FIGURA 6**



**Figura 6:** Representação esquemática da circuitaria, camadas e células principais do hipocampo. **A)** Principais componentes do circuito hipocampal. **B)** Exemplo de células de CA1 e CA3, mostrando, estruturação de camadas hipocampais.

A formação hipocampal tem as suas áreas bem divididas histologicamente (No, 1934; Silva et al., 1990):

1. - Epêndima ou zona epitelial, que forma o revestimento da superfície ventricular do hipocampo.

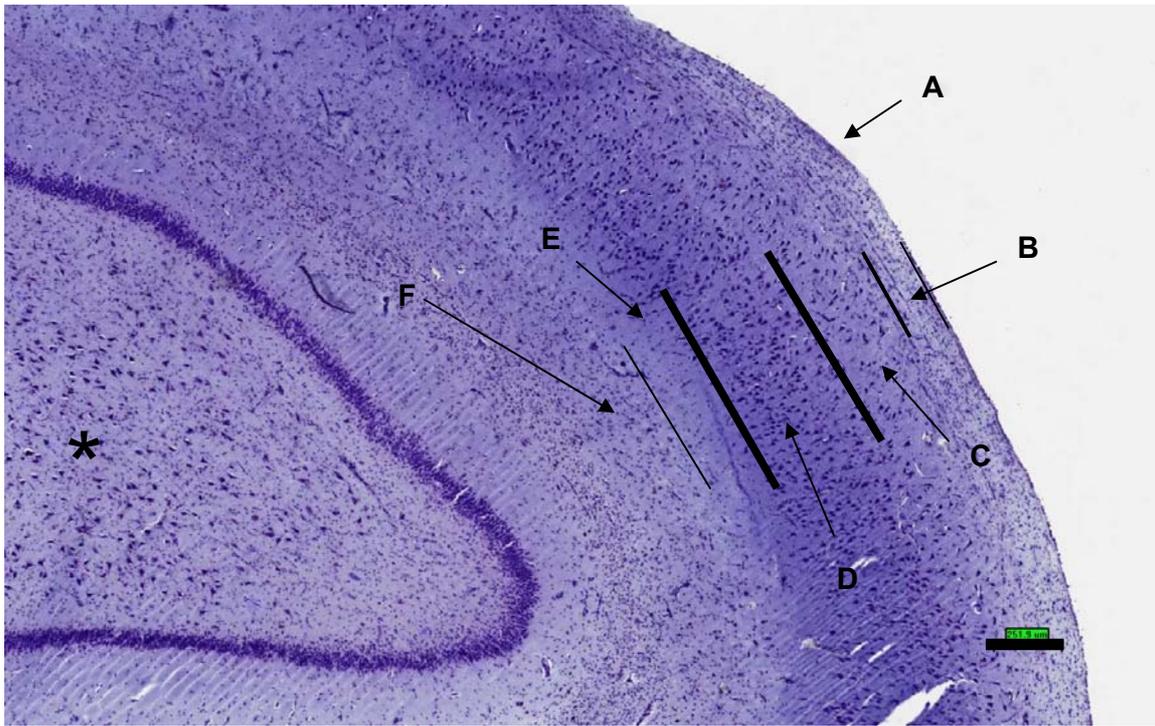
2. - Alveus, constituído por fibras aferentes e principalmente eferentes da formação hipocampal, que originam a fímbria e o fórnix.

3. - Estrato oriens, formado por axônios e dendritos basais de células piramidais, e outros tipos celulares como as células em cesto, que são interneurônios inibitórios.

4. - Estrato piramidal, composto por agrupamento denso de células piramidais que é o principal tipo de células do Corno de Ammon.

5. - Estrato radiado que é a camada que se caracteriza por corpos celulares esparsos e dendritos apicais finos, de células piramidais organizadas de forma regular, com aspecto radiado;

6. - Estrato lacunoso molecular, formado por ramificações dos dendritos apicais das células piramidais. **FIGURA 7**



**FIGURA 7:** Secção histológica da formação hipocampal, compreendendo região de CA 1, onde **A:** Zona epitelial ou de epêndima; **B:** Alveus; **C:** Estrato Oriens; **D:** Estrato Piramidal; **E:** Estrato Radiado; **F:** Estrato Lacunoso-Molecular; **\***: Hilo do giro dentado (CA 4) (Barra 300  $\mu\text{m}$ ; Cresil)

É importante ressaltar que as estruturas mesiais do lobo temporal são fundamentais para a formação da memória. Em 1958, PENFIELD e MILNER (Penfield and Milner, 1958) estabeleceram o papel crítico do hipocampo e estruturas adjacentes do lobo temporal na memória a partir da observação de pessoas com epilepsia, submetidas à lobectomia temporal, para controle de epilepsia intratável e seus achados permanecem até hoje, embora a localização exata da memória nestas estruturas ainda não seja bem entendida.

A EMT é o achado anatomopatológico de 50-70% dos pacientes com ELT refratária ao tratamento clínico, tendo a sua origem em estruturas límbicas do lobo temporal. Esta denominação ressalta o envolvimento de outras estruturas mediais como a amígdala, o giro parahipocampal, o córtex entorrinal, além do hipocampo e subiculum (Babb, 1987; Bonilha et al., 2005; Stafstrom, 2005).

O padrão referido como EH se traduz histologicamente como perda neuronal (células piramidais), que envolve o hipocampo propriamente dito, associando-se a alterações da fásia dentata. Os padrões de perda celular do hipocampo foram classificados em cinco diferentes padrões (detalhados a seguir) (Blumcke et al., 2007). Quanto às alterações do giro dentado ainda não há consenso quanto a sua nomenclatura. Porém, a International Society of Neuropathology propôs uma classificação, ainda não completamente aceita, do que chamaram displasia do giro dentado (Golden and Harding, 2004). No conceito de EMT estão contidas alterações apresentadas no lobo temporal que não são

demonstráveis pela histologia convencional, mas podem ser flagradas em estudos de imagem, ou mesmo em estudos morfométricos, que as estruturas mediais do lobo temporal apresentam, por exemplo o hipersinal do pólo temporal e também as malformações tectônicas do hipocampo (Ryvlin et al., 2002; Ryvlin et al., 1992a; Ryvlin et al., 1992b; Sloviter et al., 2004).

Apesar da relação entre a EMT e ELT já estar bem definida na literatura, o mecanismo exato pelo qual a EH participa na gênese das crises epilépticas ainda não foi inteiramente desvendado, pairando dúvidas se a EH é causa ou consequência da ELT. MEYER e colaboradores (Meyer et al., 1954) já especulavam que a EH estaria associada a uma história prévia de insulto precipitante inicial, tais como crises epilépticas que ocorrem em fases precoces do desenvolvimento cerebral humano.

Em pacientes com ELT, profundas alterações são encontradas na formação hipocampal. O aspecto macroscópico é evidente com atrofia, muitas vezes exuberante, e a presença de endurecimento. Na microscopia, há perda dos neurônios e gliose reacional. Esta perda classicamente predomina em CA1. Porém, qualquer um dos setores pode ter perda de neurônios. Em casos muito sutis existe apenas a perda de neurônios do hilo do giro dentado, sendo evidenciado pela ausência de células positivas para neuropeptídeo Y, reconhecidamente um dos sinais mais precoces da EMT. Além da perda neuronal, existe o brotamento de fibras musgosas, que são os axônios das células

granulares (denominadas de zincafins por serem ricas em zinco). Esse processo é denominado de brotamento supragranular das fibras musgosas ou “*sprouting*”, ocorrendo no giro dentado. Esse brotamento parece fazer conexões anômalas entre os axônios das próprias células granulares e seu corpo dendrítico. Esse brotamento parece fazer conexões anômalas entre os axônios das próprias células granulares e seu corpo dendrítico, gerando um circuito auto-alimentado, excitatório e reverberante, que pode ser responsável por parte da sintomatologia apresentada pelos pacientes (Nadler, 2003; Spencer, 2002a).

O espectro de alterações histopatológicas da formação hipocampal com esclerose é amplo, podendo ser dividida em dois grandes grupos:

1. – Relacionadas ao hipocampo propriamente dito.
2. – Relacionadas ao giro dentado.

O hipocampo propriamente dito, representado pelas diferentes regiões do corno de Ammon usualmente exhibe perda neuronal e gliose isomórfica (proliferação glial reativa com células semelhantes e regularmente espaçadas) e existem diferentes padrões de perda neuronal, classificados por Blumcke e colaboradores em 2007 (Blumcke et al., 2007).

A EH clássica representa a maioria dos achados anatômicos. Esta entidade se caracteriza por intensa despopulação neuronal em CA1, onde todos os outros segmentos do hipocampo têm perda neuronal, principalmente CA3 e o hilo do giro dentado. De acordo com a presença de perda neuronal em CA3

podemos subdividi-la em Tipo 1A (moderada perda) e tipo 1B (intensa perda). Ambas são apresentadas por pacientes com as mesmas características clínicas e têm semelhante implicação prognóstica.

Lanerolle em 2003 descreveu uma nova “subcategoria” de EH, referida como esclerose de CA1. Esta entidade se caracteriza pela perda de neurônios piramidais apenas na região de CA1, com gliose reativa, referida com EH Tipo 2 por Blumcke e cols.(Blumcke et al., 2007). Esta entidade, também pertence ao grupo da EH atípica, está relacionada com um pior prognóstico pós-cirúrgico e também se relaciona com um evento precipitante inicial tardio.

A esclerose da placa terminal (*end folium*), também pertencente ao grupo da EH atípica, se caracteriza pela perda de neurônios restrita ao hilo do giro dentado, referida como Tipo 3 por Blumcke e cols. (Blumcke et al., 2007). Esta entidade é de difícil diagnóstico na microscopia óptica comum, uma vez que a perda celular e gliose podem ser brandas. Desta forma, a ausência de neurônios na periferia do hilo do giro dentado, células usualmente positivas para neuropeptídeo Y, substância P e somatostatina é de grande valia para o diagnóstico desta entidade. Seu reconhecimento é importante, pois tem a mesma implicação prognóstica da EH Tipo 2. Cumpre ressaltar que as características clínicas dos pacientes também são semelhantes (Blumcke et al., 2007).

Resta ainda um grupo de pacientes que não tem alterações relacionadas à perda celular no hipocampo. Este grupo de pacientes tem eventos iniciais mais

tardios que os apresentados pelo grupo da esclerose hipocampal atípica, e tem prognóstico intermediário entre o grupo da EH típica e o grupo da EH atípica. Alguns trabalhos tentaram demonstrar alterações nestes hipocampos, enquanto outros enfatizam a relação com outras doenças como cavernomas (Blumcke et al., 2007; Sloviter et al., 2004).

O giro dentado também exhibe alterações de dois tipos, basicamente. A mais comum é a dispersão das células granulares, que acompanha muitas vezes a esclerose típica do hipocampo (Blumcke et al., 2007). Esta alteração se caracteriza pela alteração da forma das células granulares, que assumem aspecto fusiforme e espessam o estrato granuloso. Algumas células têm disposição paralela ao giro dentado (Golden and Harding, 2004).

O outro padrão de alteração é chamado de desdobramento ou bilaminação. Nesta anomalia, a camada externa de células granulares se desprende do giro dentado e constitui uma camada mono ou bicelular, separada por uma faixa com poucas células (Golden and Harding, 2004). Esta alteração pode ser parcial ou completa (Rougier et al., 2005; Rougier et al., 2003).

As alterações do giro dentado são consideradas adquiridas, exceto o desdobramento total, que se acredita pertencer ao grupo das malformações (Rougier et al., 2003).

### 1.3 INFLAMAÇÃO

O termo inflamação foi introduzido cerca de 2000 anos atrás por Celsus em dois dos oito volumes que este devotou a história da medicina. Literalmente, inflamação significa atear fogo. No terceiro volume Celsus mencionou os quatro sinais e sintomas que ele julgou característicos da “inflamação” referidos como rubor, tumor, calor e dor (dolor) (Celsus, Primeiro Século dC).

Entretanto, em 1859, Rudolf Virchow, no seu trabalho clássico *Cellularpathologie* (Virchow, 1854), descreveu: “A inflamação é o processo patológico mais comum no tecido, causado por um estímulo que evoca alterações em partes celulares do tecido, onde se segue a perda da função tecidual”. Assim, foi Virchow quem introduziu o quinto sinal da inflamação “*functio laesa*”. Na patologia virchowiana tradicional as outras manifestações das doenças são: neoplasia, hiperplasia, hamartoma, malformação, degeneração e cistos.

Em 1877, Cohnhein observou que: nos órgãos menos inervados a dor era menos proeminente; em regiões desprovidas de vasos sanguíneos, a inflamação não tinha cor avermelhada e; onde os vasos linfáticos estavam intactos, o tumor (inchaço, edema) não se desenvolvia” (Cohnhein, 1877).

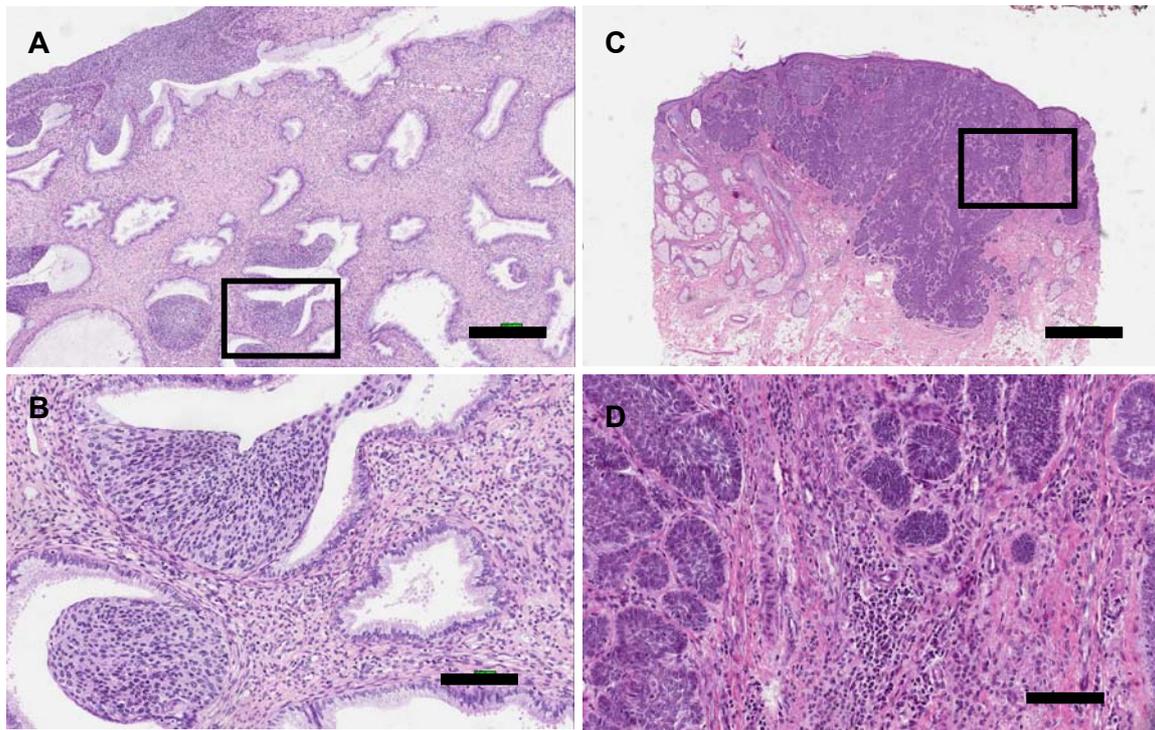
Notamos que, apesar da inflamação ser um processo de grande importância, ainda não tem uma definição precisa sobre o que vem a ser inflamação, processo inflamatório e doença inflamatória. Apenas existem

descrições que perduraram por séculos, uma vez que constituem as manifestações reais deste processo, quando observadas clinicamente e histologicamente.

Com o passar do tempo é necessário que tenhamos uma definição que nos permita excluir os demais processos patológicos, tanto por razões acadêmicas, quanto por razões práticas. Muitas definições foram propostas em livros de patologia especial e patologia geral. Porém, a definição mais adequada foi proposta por Ackerman e Böer (Ackerman et al., 2005; Böer et al., 2003):

**INFLAMAÇÃO:** “Alterações teciduais que ocorrem tipicamente como reação a injúria de qualquer tipo (mecânica, actínica, química, alérgica, infecciosa e efeitos de neoplasias) e caracterizadas clinicamente por sinais específicos e histopatologicamente por vasodilatação e infiltrados de células inflamatórias, estas sendo especialmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e histiócitos”.

## **FIGURA 8**



**FIGURA 8:** Exemplos da ocorrência de inflamação relacionadas a outros processos patológicos, neste caso neoplasias. **A)** Carcinoma espinocelular “*in situ*” do colo uterino com extensão glandular (Barra 400  $\mu\text{m}$ , Hematoxilina&Eosina) **B)** Ampliação de “**A**” mostrando foco extensão glandular e infiltrado mononucleado estromal adjacente (Barra 100  $\mu\text{m}$ , Hematoxilina&Eosina). **C)** Carcinoma basocelular da pele, tipo nodular, sem ulceração (Barra 1000  $\mu\text{m}$ , Hematoxilina&Eosina) **D)** Ampliação de “**C**” mostrando infiltrado mononucleado estromal adjacente (Barra 100  $\mu\text{m}$ , Hematoxilina&Eosina).

Inflamatório é outro termo que carece de definição e muitas vezes é evocado quando se referem à inflamação. Inflamatório é um adjetivo que significa “pertencente à inflamação”. Este termo, então, pode ser relacionado com as alterações pertencentes ao processo inflamatório (Böer et al., 2003).

Visto o exposto acima, o que vem a ser doença? Um termo presente em praticamente toda a literatura médica, que pode (e deve) ser amplo e abrangente. Como doença, consideramos qualquer alteração, que não seja fisiológica, na estrutura ou função de qualquer parte de órgão, sistema ou mesmo do corpo como um todo. A diferenciação entre moléstia e doença reside na subjetividade, pois moléstia diz respeito ao que o paciente sente (Böer et al., 2003). Ainda doença pode fazer parte do nome de uma entidade patológica (p.ex. doença de Cushing e doença de Devic).

Por fim falta referência ao grupo de doenças, referidas como inflamatórias:

“DOENÇA INFLAMATÓRIA: Uma desordem caracterizada histopatologicamente pelo infiltrado de células inflamatórias e, por vezes, por alterações secundárias aos efeitos destas, onde o infiltrado não está afiliado a qualquer outro processo patológico fundamental (como neoplasias)”(Ackerman et al., 2005; Böer et al., 2003).

Com o avançar do conhecimento um número muito grande de mediadores do processo inflamatório passou a ser descrito e também estudado para que a

manipulação terapêutica desta reação pudesse ser realizada. Os diferentes mediadores podem ser divididos em alguns grandes grupos (Kumar et al., 2004):

1-Aminas vasoativas: que englobam a histamina e a serotonina, mediadores lançados precocemente no processo.

2-Proteínas plasmáticas: que constituem um grupo extenso de mediadores, sendo representados pelo sistema do complemento, sistema das cininas e sistema de coagulação sanguínea.

3-Metabólitos do ácido araquidônico: representados pelas prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas.

4-Fator ativador de plaquetas (PAF).

5- Citocinas e quimiocinas: que constituem um amplo grupo de mediadores com diversas ações.

6-Óxido nítrico (NO).

7-Constituintes lisossomais dos leucócitos.

8-Radicais livres derivados do oxigênio.

9-Neuropeptídeos.

Devido à extensão dos mediadores inflamatórios centrarei a descrição a somente alguns, pertinentes a esse trabalho: o óxido nítrico, a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral alpha (TNF $\alpha$ ), os dois últimos considerados citocinas.

O NO, um potente vasodilatador, é um mediador pleiotrópico de inflamação, sendo responsável por muitas manifestações desse processo, mas tem também ação na neurotransmissão normal e fisiológica (Kandel et al., 2002). O NO é sintetizado a partir do nitrogênio guanidino da L-arginina, na presença de oxigênio molecular, passando a L-citrulina e NO. A enzima envolvida no processo é a óxido nítrico sintetase (Almeida et al., 1999) uma enzima cálcio e calmodulina dependente. Tem três isoformas, duas constitutivas, presentes no endotélio (eNOS) e neurônios (nNOS), além de uma forma indutível (iNOS) (Adkinson et al., 2003).

O NO promove vasodilatação pelo relaxamento das células musculares lisas dos vasos, reduz a agregação plaquetária, reduz os efeitos inflamatórios, derivados de mastócitos e reduz a rolagem e adesão dos leucócitos nas vênulas pós-capilares, apresentando assim um misto de ação inflamatória e anti-inflamatória. Na presença do radical livre, o ânion superóxido o NO se transforma em peroxinitrito, um radical livre muito nocivo (Saleh et al., 1998). Estas moléculas, muitas vezes geradas em vários tecidos têm ação bactericida (Kumar et al., 2004). Porém, são danosas ao organismo, levando a fragmentação do DNA, inibição do metabolismo oxidativo mitocondrial, ativam o NF- $\kappa$ B (que leva a produção de citocinas inflamatórias) e ocasiona a apoptose de células epiteliais (Janssen-Heininger et al., 2002).

A ação do NO é feita por via parácrina, uma vez que é um gás solúvel e tem meia vida muito curta *in vivo*, de pouco segundos, apenas. Nas células alvo a sua ação é feita de duas formas. Pela ativação do NF-κB que leva a um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, referido acima e pela inativação oxidativa de proteínas tirosina-fosfatases, o que acarreta em um aumento da sinalização do sistema da fosfotirosina (Forman and Torres, 2002).

Alguns pormenores da ação antiinflamatória do NO ainda não são bem compreendidos, mas evidências mostram que o aumento crônico da expressão da NOS protege contra a lesão inflamatória (Laroux et al., 2001). A deficiência genética de NOS, por outro lado, aumenta a lesão causada pela inflamação tissular (De Sanctis et al., 1999).

Na transmissão sináptica a NOS é induzido em resposta à estimulação do receptor NMDA de glutamato. O NO produzido atua com mensageiro retrógrado na potenciação duradoura (LPT) (Kandel et al., 2002). Assim, a liberação de demasiada de glutamato leva a uma produção de NO, além de levar ao dano excitotóxico do neurônio pós-sináptico. A morte celular por excitotoxicidade é também é causa de inflamação, que por sua vez leva a produção de mais NO.

O TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são mediadores inflamatórios produzidos principalmente por macrófagos. Porém um número muito grande de células também os produz em quantidades bem menores. Os estímulos que levam a

produção destes mediadores são muitos. Entre eles estão as endotoxinas bacterianas, vírus, di-isocianato de tolueno, interferons, taquicininas, fragmentos do complemento, leucotrienos e a estimulação direta dos macrófagos. A inibição de sua produção também é feita por muitas formas, tais como pela ação de corticóides, pela ação da prostaglandina E2 (PGE2) e por imunomoduladores.

As suas ações mais importantes relacionam-se com a indução das reações de fase aguda, mas também na inflamação crônica tem um papel importante na perpetuação do processo, pois induzem a produção de uma variedade de outras citocinas, fatores estimulantes de colônia e ativam as células inflamatórias. No endotélio, levam a muitas alterações relacionadas à transcrição gênica (ativação endotelial), com a produção de NO e a síntese de moléculas de adesão. Além disto, há aumento da trombogenicidade do endotélio e alteração do fluxo sanguíneo localmente.

A ação destes mediadores é realizada via receptores acoplados à proteína G. Assim, existe ativação da tirosina cinase e da proteína cinase C, com aumento na expressão gênica do NF- $\kappa$ B.

A IL1 $\beta$  e o TNF $\alpha$  têm ações muito semelhantes, ambas com grande atividade pró-inflamatória. Diferem em alguns detalhes como o aumento da expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) tipo 1 e 2, e pelo fato de que o TNF $\alpha$  tem uma ação apoptótica em diversos tipos celulares, tal ação que lhe conferiu o nome.

Deste modo é possível se observar que estes mediadores têm fundamental importância no processo inflamatório como um todo, desde as suas fases mais precoces quanto também na cronicidade do processo. Assim constituem-se em ótimos marcadores para a presença de inflamação e na sua quantificação, associando-se de forma importante aos achados histopatológicos na elucidação do processo que se desenvolve frente a uma agressão qualquer em um tecido vivo.

#### **1.4 EXCITOTOXICIDADE E INFLAMAÇÃO NA EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central e, quando liberado em grandes quantidades, pode gerar um fenômeno conhecido como excitotoxicidade. Frente a diferentes insultos, como isquemia, crises epilépticas prolongadas e uma variedade de doenças neurodegenerativas, grandes quantidades de glutamato são liberadas na fenda sináptica. Uma vez na fenda sináptica o glutamato pode se ligar a cinco receptores diferentes, três deles ionotrópicos e dois deles metabotrópicos. Os ionotrópicos são o n-metil-d-aspartato (NMDA); o kainato (KA); o amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxale-4-propionato (AMPA), que são constituídos por proteínas que formam canais iônicos, permeáveis a cátions. Os receptores metabotrópicos são o ácido-L-2-

amino-4-fosfanobutanóico (L-AP4) e 1S-3R-trans-1-amino-ciclopentil-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD) e sua ativação é dependente da proteína G, com geração de segundos mensageiros (Fillenz, 1995).

A ligação do glutamato (L-glutamato) aos receptores ionotrópicos leva a uma abertura de canais iônicos e conseqüente entrada de sódio e saída de potássio, para a geração de um potencial de ação. Dentre os receptores ionotrópicos podemos subdividi-los em NMDA e não-NMDA, pelas diferenças fisiológicas que se seguem. Os receptores de glutamato não-NMDA controlam canais iônicos de baixa condutância (cerca de 20 pico Siemens – pS), que são permeáveis ao sódio e ao potássio. Porém são pouco permeáveis ao cálcio. Eles são os receptores responsáveis pelo componente precoce do potencial excitatório pós-sináptico (Fillenz, 1995; Kandel et al., 2002).

Os receptores de glutamato tipo NMDA requerem um co-fator para que o glutamato exerça seu papel, este co-fator é a glicina, usualmente presente em quantidades suficientes no fluido intersticial. Outra particularidade deste receptor é a sua grande condutância (da ordem de 50 pS). Além da permeabilidade ao cálcio, este receptor contribui para o componente tardio do potencial excitatório pós-sináptico. Para que este receptor funcione plenamente, além do co-fator acima referido, é preciso que exista despolarização da membrana celular previamente, através da ativação dos receptores AMPA e KA, pois existe na estrutura do canal iônico do receptor NMDA o íon magnésio, que exerce função de “rolha”, que se

desliga do receptor quando a membrana se despolariza. Outra particularidade é que a despolarização da membrana celular também ativa este receptor. Assim, o receptor NMDA funciona plenamente apenas quando duas condições estão satisfeitas: existe a despolarização da membrana celular e há glutamato livre (Fillenz, 1995; Kandel et al., 2002).

Além do influxo de cálcio extracelular, oriundo da ativação excessiva dos receptores de glutamato tipo NMDA, pode ocorrer a ativação dos receptores metabotrópicos do glutamato, pode levar a mobilização de mais cálcio, oriundo de estoques intracelulares (Fillenz, 1995). Este processo leva ao acúmulo do cátion  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol do neurônio pós-sináptico.

Os íons de cálcio, quando em excesso, são mediadores importantes de injúria celular e, portanto, são mantidos em concentrações inferiores a  $0,1 \mu\text{M}$ , no interior do neurônio, bem diferentes das concentrações extracelulares que são da ordem de  $1,3 \text{ mMol}$  (Kumar et al., 2004). O cálcio intracelular está sempre seqüestrado nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático para manter os níveis citoplasmáticos constantes. Se o receptor NMDA é ativado por excesso de glutamato na fenda, a concentração de cálcio intracelular aumenta drasticamente. Esse excesso de cálcio livre, citosólico, ativa uma série de grupos de enzimas (Orrenius et al., 2003; Paschen, 2000) responsáveis pelo processo de excitotoxicidade. Esses eventos incluem:

- Ativação das ATPases: que levam a redução de ATP com conseqüente perda das funções dependentes de energia.

- Ativação das fosfolipases: que levam a degradação das membranas celulares.

- Ativação de proteases: que degradam o citoesqueleto.

- Ativação das endonucleases, que são responsáveis pela fragmentação da cromatina.

As alterações da membrana mitocondrial podem levar a saída de proteínas que por sua vez podem dar início ao processo de apoptose (morte celular programada) (Kumar et al., 2004). O conjunto de alterações acima referidas é dependente do aumento da concentração do íon  $Ca^{2+}$  e da falha dos mecanismos de remoção do glutamato, pelos transportadores desse aminoácido, presentes nos neurônios e nas células da glia. Isso acarreta aumento descontrolado e anormal da concentração de glutamato na fenda sináptica, que acarreta a morte celular em um fenômeno conhecido por **excitotoxicidade** (Paschen, 2000).

Dentre as principais proteínas que se destacam neste processo de lesão celular encontram-se:

1. Fosfolipase A2: Enzima que degrada fosfolípidos da membrana celular e libera ácido araquidônico. A lesão na membrana celular amplia a permeabilidade aos íons nocivos. Com a ativação secundária de ciclooxigenase e

lipooxigenase ocorre a produção de prostaglandinas e leucotrienos (respectivamente) mediadores do processo inflamatório (Kontos et al., 1980).

2. Fosfolipase C: Promove a quebra do fosfatidil inositol, presente na membrana citoplasmática, gerando diacil-glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). O IP3 tem ação no retículo endoplasmático onde promove a liberação de  $Ca^{2+}$  seqüestrado nos calciossomas. O DAG promove a ativação da proteína cinase C que irá modificar o estado de muitas proteínas citoplasmáticas.

3. Ativação da óxido nítrico sintetase.

4. Proteína cinase II: Enzima dependente de cálcio e calmodulina, que quando ativada fosforila a sinapsina (proteína envolvida na exocitose de vesículas sinápticas). Esta fosforilação aumenta ainda mais a exocitose de vesículas contendo glutamato (Nichols et al., 1990).

5. Endonucleases.

6. Calpaína I e II: Enzimas proteolíticas que induzem a degradação da espectrina e de neurofilamentos, lesando o citoesqueleto (Melloni and Pontremoli, 1989).

Tal processo tem sido descrito em muitas e diversas doenças do sistema nervoso, não apenas no estado de mal epiléptico ou em crises prolongadas, mas também na isquemia cerebral focal e generalizada, na doença de Huntington, Parkinson e também na doença de Alzheimer (Meldrum and Garthwaite, 1990).

A ativação secundária da fosfolipase A2, da enzima óxido nítrico sintetase e da proteína cinase II levam a produção de mediadores inflamatórios o que relaciona a excitotoxicidade com o processo inflamatório. Entretanto, o maior estímulo ao início do processo inflamatório é a morte celular por necrose (Dorries, 2001), que acontece durante o processo de excitotoxicidade (Vezzani et al., 2008).

As reações inflamatórias ocorrem em uma grande variedade de doenças do sistema nervoso, incluindo doenças neurodegenerativas, neoplasias, doenças metabólicas, autoimunes e também na epilepsia de lobo temporal secundária a esclerose mesial temporal (Choi and Koh, 2008; Dickson, 2003; Golden and Harding, 2004; Vezzani and Granata, 2005). O sistema nervoso é considerado um dos santuários do sistema imune uma vez que muitos de seus antígenos estão seqüestrados do sistema imunológico pelo advento da barreira hemato-encefálica (Wucherpfennig, 1994). Um estímulo a inflamação no sistema nervoso leva a ativação de diversos genes e também a invasão deste por células efectoras do sistema imune, além da ativação da micróglia (que são “macrófagos” residentes do sistema nervoso) (Wucherpfennig, 1994).

Com a resposta inflamatória, muitos antígenos seqüestrados são reconhecidos pelos linfócitos T ativados, o que pode ser a causa de doenças autoimunes que alvejam a mielina, por exemplo. Desta forma, pode ser gerada uma autoimunidade, que é um evento durador e autodestrutivo, ou ocorrer a

erradicação do agente iniciador do processo com a formação ou não de uma cicatriz (proliferação glial cicatricial) (Wekerle, 1993).

Na ELT, a ocorrência de inflamação tanto em modelos experimentais quanto nos pacientes tem sido exaustivamente investigada (Vezzani and Granata, 2005). Uma gama muito grande de mediadores tem sido envolvida nas reações inflamatórias nesta doença, e que a cada dia que passa, a lista dos mediadores inflamatórios aumenta, tal a importância deste processo nesta doença (Choi and Koh, 2008). Tanto em modelos experimentais quanto em seres humanos a ativação de vias distintas da cascata da inflamação pode ser verificada. O sistema calicreína-cininas, ligado a liberação de peptídeos relacionados a vasodilatação, edema, liberação de prostaglandinas e NO tem sido estudado, pelo nosso grupo, em humanos com ELT (Perosa e col 2007) assim como em roedores (Arganaraz et al., 2004). Os resultados mostram o envolvimento desses peptídeos na geração de crises.

Outros autores têm mostrado que o córtex entorrinal, de pacientes com ELT associada à esclerose mesial, tem um aumento na expressão dos genes que codificam o receptor de 5HT ( HTR2A), do receptor de neuropeptídeo Y tipo 1, da proteína FHL2 associada ao canal de potássio (KCNE1) e a pressenilina2, além do fator C3 do complemento, dos antígenos leucocitários humanos (HLA-DR-gamma) e do CD99. Estas últimas são moléculas efetoras do sistema imunológico (Jamali et al., 2006). Tal evidência mostra a ligação da ELT e inflamação, mesmo

na fase crônica, evidenciando que esta doença não é restrita ao hipocampo, como o já referido anteriormente.

A perda neuronal e a gliose reacional subsequente têm sido descritas há muito tempo nas epilepsias (Thom et al., 2008). Secundariamente ao processo de excitotoxicidade há aumento da expressão do NF $\kappa$ B e deslocamento deste para o núcleo de neurônios. Estes neurônios se localizam mais freqüentemente nas regiões com maior sofrimento e perda celular (CA3 no hipocampo), onde há também o aparecimento de células da micróglia com expressão de MHC.

Modelos de epilepsia experimental com a indução direta de excitotoxicidade mostram a ligação entre ambos processos desde os momentos mais precoces da epileptogênese, nas áreas onde há perda neuronal e gliose reacional (Lerner-Natoli et al., 2000). Assim, observamos que a excitotoxicidade e a inflamação são fenômenos paralelos.

Citocinas pró-inflamatórias potentes como a IL1 $\beta$  também já foram alvo de estudos no campo experimental. No modelo de epilepsia induzida pelo ácido caínico esta citocina mostrou grande aumento de concentração no hipocampo, 24 horas após a injeção. No mesmo trabalho os autores mostraram um aumento, de menores proporções de IL1 $\beta$ , quando se realizava a injeção de bicuculina (que causa convulsões sem levar à perda neuronal), mostrando que a liberação desta citocina não é consequência apenas da necrose celular, mas também é consequência da lesão excitotóxica. O tratamento prévio com IL1 $\beta$  leva a um

prolongamento do tempo de *status epilepticus* (SE) sofrido pelos animais. Tal efeito deve-se a facilitação da transmissão glutamatérgica (Vezzani et al., 1999; Vezzani et al., 2008).

O antagonista de receptor de IL1 $\beta$  (IL1-ra) mostra a importância desta citocina para a gênese do SE induzido pela bicuculina. Camundongos transgênicos com hiperexpressão de IL1-ra e camundongos com pré-tratamento com IL1-ra tem inibição de convulsões motoras e eletrencefalográficas. Há ainda uma redução da expressão do RNA mensageiro de c-fos em diversos neurônios cerebrais, o que evidencia a ausência de ativação do metabolismo de estresse destas células (Vezzani et al., 2000). Tais dados mostram que o balanço entre a IL1 $\beta$  e a IL1-ra tem importância no que tange a generalização das crises epilépticas.

Assim, o processo inflamatório associado à excitotoxicidade parece ter relação causal com a ELT por EH. O desequilíbrio entre excitação e inibição, a liberação de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas sinalizadoras, de vida curta, como o NO, podem estar relacionados com a manutenção desta síndrome (Choi and Koh, 2008). Nesse contexto, os achados de neuroimagem e os resultados anatomopatológicos parecem indicar um processo ativo, crônico, com a presença de inflamação e lesão excitotóxica contínua e não simplesmente uma cicatriz glial. Assim, nosso estudo objetiva a verificação da existência ou não de uma correlação positiva entre os níveis de mediadores da inflamação e de

excitabilidade com níveis de atrofia hipocampal, verificados nos achados de neuroimagem. Esses dados serão importantes para a construção de novas abordagens terapêuticas, que possam emergir em benefício dos próprios pacientes (Choi and Koh, 2008; Vezzani, 2005).

## 2.0 OBJETIVOS

### Objetivo Geral:

Estudar a existência de correlação entre: tipos de EH segundo Blumcke et al., 2007, hipersinal na RM e processo inflamatório, em pacientes com ELT associada à EH.

### Objetivos específicos:

Nesse processo serão analisados os seguintes componentes:

1. Quantificação no hipocampo com esclerose e tecido controle dos seguintes mediadores - NO, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , GLU e GABA fazendo comparação entre os dois grupos.
2. Correlacionar a intensidade do sinal do hipocampo (cabeça, corpo e cauda) presente na RM com as concentrações dos mediadores (NO, IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , GLU).
3. Correlação da intensidade do sinal da RM na cabeça, corpo e cauda do hipocampo afetado (ipsilateral) com o contralateral.
4. Classificar os pacientes na escala de Engel e dentro de cada grau comparar as concentrações de NO, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , GLU e GABA.
5. Classificar os tipos de EH e dentro de cada subtipo comparar níveis de NO, IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , GLU e GABA.
6. Discorrer sobre possíveis alterações quanto à lateralidade do processo.

### 3.0 CASUÍSTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM, sob o número CEP 1230/06 e 1091/06 (anexo 1 e 2).

Foram incluídos nesse trabalho 29 pacientes com ELT por EMT, unilateral, refratária ao tratamento medicamentoso, que foram submetidos ao tratamento cirúrgico, entre os anos de 2006 e 2007. O tecido cerebral obtido destes pacientes foi pareado com dez tecidos controles, obtidos de autópsia cuja causa de óbito não foi inflamatória ou neurológica. Os pacientes desta pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e informado (anexo 5) e os pacientes autopsiados foram provenientes do INCOR, com consentimento familiar para a realização da autópsia e uso dos tecidos retirados para fins de estudo e pesquisa (anexo 3 e 4). A autópsia foi sempre realizada por um mesmo patologista do INCOR, previamente treinado, de modo a serem removidas sempre a mesmas regiões cerebrais, de modo a serem comparáveis com a regiões removidas na cirurgia. Além disso, a autópsia era sempre realizada com menos de 6h, após a morte do indivíduo.

Os pacientes com ELT refratária se encontravam em acompanhamento regular no ambulatório de Epilepsia de Adultos do Hospital São Paulo, na Unidade de Pesquisa e Tratamento das Epilepsias (UNIPETE) da Universidade Federal de

São Paulo, Escola Paulista de Medicina, com seguimento pós-operatório mínimo de um ano.

### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS

O diagnóstico de ELT foi feito segundo as características clínicas e eletrográficas previamente descritas na Classificação de Epilepsias e Síndromes Epilépticas da ILAE, de 1989 (ILAE, 1989) e o diagnóstico de EMT unilateral, pela presença de características clínicas e neurofisiológicas da síndrome da ELT por EH citadas por Wieser (Wieser, 2004). Todos os pacientes apresentavam sinais sugestivos de EH unilateral na RM.

Considerou-se como epilepsia refratária as que tiveram crises persistentes frente ao tratamento com pelo menos duas drogas de primeira linha para tratamento de crises parciais, em monoterapia ou em associação com outras drogas antiepilépticas, em níveis comprovadamente subtóxicos dessas drogas.

Foram analisadas características demográficas como idade, sexo e lado da lesão. Mas também a idade de início da epilepsia, sua duração presença ou ausência de evento precipitante inicial e a presença de alteração de sinal do pólo temporal.

### 3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os pacientes que apresentavam patologia dupla, definida como EMT associada à displasia cortical focal. Excluindo-se também pacientes com tumores do sistema nervoso central. Um paciente com cisticercose calcificada extratemporal (occipital) foi incluído no estudo.

## **4.0 METODOLOGIA**

Durante o ato cirúrgico, logo que a formação hipocampal fosse retirada esta foi avaliada macroscopicamente para a identificação da margem de ressecção posterior (área cruenta) e sua porção anterior identificada. Considerou-se como cabeça do hipocampo o primeiro centímetro, onde este foi seccionado. Esta porção foi utilizada em todos os ensaios que necessitavam de hipocampo homogeneizado. A porção posterior foi processada histologicamente, como o descrito a seguir e incluída de modo a que as primeiras secções fossem as mais posteriores possíveis, evitando assim que a análise histopatológica ficasse comprometida.

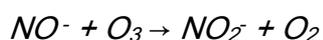
### **4.1 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO**

Logo após a retirada do tecido cerebral, a cabeça do hipocampo foi separada do corpo, sendo colocado em frasco virgem e congelado em nitrogênio líquido em menos de 20 segundos. O mesmo procedimento foi efetuado tanto para tecido controle, quanto para tecido proveniente da cirurgia da ELT e esse tecido foi usado em todos os ensaios bioquímicos, descritos a seguir.

As amostras foram homogeneizadas com tampão obedecendo à proporção de 1mg de tecido para 5 ml de tampão Tris 0,01 M, pH 7,4 contendo

KCl 0,2 M. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Foram coletados 1 ml do sobrenadante e foi feita a desproteíntização com 2 ml de NaOH 0,5 M e 2 ml de ZnSO<sub>4</sub> a 10%. O tecido foi homogeneizado por 30 segundos e incubado em temperatura ambiente por 15 minutos. Seguiu-se nova centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi armazenado para a dosagem de óxido nítrico (NO).

A determinação do NO foi feita através do aparelho *Nitric Oxide Analyzer* (NOA™ 280, Sievers Instruments, Inc, Boulder, CO, USA) através da técnica de quimioluminescência (Hampl et al., 1996). O método proporciona uma alta sensibilidade (detecção de 1 picomol) na quantificação direta do NO, sendo necessários apenas 10µL por amostra do sobrenadante desproteíntizado. No aparelho o nitrito e nitrato, metabólitos estáveis do NO reagem com o cloreto de vanádio (VCl<sub>3</sub>) e são convertidos novamente em NO. Agora, na forma gasosa o NO é captado em um compartimento específico do NOA, reagindo com ozônio, e nesta reação haverá formação de oxigênio e ânions de dióxido de nitrogênio:



Estes ânions se estabilizam em nitrito havendo perda de elétrons através da emissão de fótons de luz ( $h\nu$ ):



Estes fótons de luz são detectados pelo tubo fotomultiplicador que desloca elétrons para o dinodo, e deste para o ânodo produzindo uma corrente

elétrica. A intensidade dessa corrente é então processada pelo programa de computador *Software NOAnalysis*<sup>TM</sup>. A concentração de NO foi então expressa em micromoles por mg de tecido úmido.

## 4.2 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISSORES

Durante o procedimento cirúrgico a estrutura hipocampal foi ressecada e, logo após, o hipocampo foi seccionado separando-se a cabeça do corpo. A cabeça foi acondicionada em frasco virgem, e congelada rapidamente em nitrogênio líquido. As amostras foram homogeneizadas em ultra-som em uma solução contendo ácido perclórico 0,1M e 0,02% de dissulfito de sódio e homosserina (HSER) 10 mg/ml, utilizada como padrão interno nas dosagens de aminoácidos.

Para a homogeneização foi utilizado 15ml de solução/mg de tecido úmido. As amostras ficaram em repouso durante uma noite a 0°C para a precipitação de proteínas e posteriormente foram centrifugadas a 11.000 *g* durante 50 minutos. O sobrenadante foi filtrado e submetido a uma derivatização com o-oftaldeído (De Sanctis et al.) e injetado no HPLC para a quantificação de amostras.

A derivatização dos aminoácidos foi feita dissolvendo-se 27 mg de OPA em 1 ml de metanol, adicionando 5 µl de 2-mercaptoetanol e 9 ml de tetraborato de sódio 0,1M (pH 9,3).

Antes da análise das amostras, uma solução foi preparada diluindo-se 1 ml da solução estoque com 2 ml da solução de tetraborato de sódio a 0,1 M. A derivatização pré-coluna se completa reagindo-se 100 µl desta solução com 50 µl da amostra ou da solução padrão de aminoácidos, por exatamente 2 minutos antes da injeção na coluna analítica.

O sistema HPLC utilizado consistiu em um sistema isocrático que possui uma bomba marca Milton Roy modelo Constametric 3000, um detector de fluorescência marca Shimadzu RF-10AxL, um injetor de amostras para HPLC Mara Rheodyne modelo 7125 com loop de 20 µl, uma coluna RP-18 50 x 4,6 mm marca Merck chromolith SpeedROD, um módulo de comunicação Shimadzu CBM-101, um programa de análise de cromatografias Shimadzu Class-LC10, um microcomputador Pentium 28MB RAM marca Intel Inside, um monitor marca Samsung modelo Syncmaster 3NE e uma impressora marca Hewlett Packard modelo Deskjet 692C.

A fase móvel foi constituída por uma mistura de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 5,95) com metanol 11,5%.

As condições do sistema de HPLC nesse método foram fluxo de 3,0 ml por minuto, detecção com excitação de 348 nm e emissão de 460 nm.

Para estabelecermos o cromatograma padrão, todos os aminoácidos foram testados (alanina, aspartado, arginina, aspargina, cisteína, fenilalanina, GABA, glutamina, glutamato, glicina, homoserina, histidina, isoleucina, lisina,

leucina, metionina, prolina, serina, taurina, tirosina, treonina, triptofano e valina) e o tempo de retenção na coluna foi avaliado para cada aminoácido. Desta forma pudemos verificar que, nas condições empregadas, não havia sobreposição de picos na saída das amostras. Assim, a seqüência de aminoácidos que padronizou este método (por ordem de tempo de retenção, foram o ASP, GLU, GLN, HSER, GLI, TAU, GABA). Os outros aminoácidos não foram avaliados nesse trabalho.

Foram feitas soluções estoques contendo ASP, GLU, GLN, HSER, GLI, TAU, e GABA de concentração 1 mg/ml diluídos em ácido perclórico 0,1M, e a solução de uso foi diluída cem vezes para ser derivatizada.

Os resultados são expressos em nanogramas por miligrama de tecido, segundo a equação:

$$C = \frac{h_{\text{aas amostra}}}{h_{\text{aas padrão}}} \times [ ]_{\text{aas}} \times \text{fator de diluição OPA}$$

$$h_{\text{Hser amostra}} : h_{\text{Hser padrão}}$$

onde h = altura; aas = aminoácido; [ ] = concentração.

### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE INTERLEUCINA 1 BETA E FATOR DE NECROSE TUMORAL

#### Quantificação de Proteínas

As amostras foram homogeneizadas em tampão que continha 0,1M NaCl, 0,001M Tris-HCl pH 7,6, 0,001M EDTA pH 8,0, 1% NP-40 (*Nonidet P -40*), 10%

glicerol, 10  $\mu$ M PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoreto), 1mM metavanadato de sódio, 0,05 M NaF (fluoreto de sódio) e inibidores de protease (*Aprotinina 0,08mM, Leupeptina 2mM, Pepstatina A 1,5 mM, Bestatina 4mM e E64 1,4 mM, Sigma*). Os tecidos foram homogeneizados por ultra-som (Virsonic 60 da Virtis) e estocados no freezer -80°C até o dia dos ensaios. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Lowry e cols (Lowry et al., 1951).

### **Curva Padrão para as citocinas**

As duas citocinas foram quantificadas no hipocampo, usando-se kits de Elisa provenientes da BD Bioscience OprEI™, que foram ensaiados segundo a especificação do fabricante.

Para a realização da curva padrão das citocinas usamos concentrações conhecidas de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  (50, 100, 150, 200, 250 e 300pg/ml) e todos os ensaios foram feitos em duplicata. A linearidade foi encontrada nessa faixa.

Processamos, no mesmo ensaio, concentrações diferentes de proteínas totais, do tecido cerebral controle para que a faixa de leitura da citocina, na amostra, estivesse dentro da faixa linear do método. Para tanto, um volume de amostra contendo cerca de 80ug de proteínas totais foi empregado em todos os ensaios. Utilizamos o diluente ELISA do kit (*0,09% de sódio azida*) (Human IL – 1 ELISA Kit BD Opteia™ e Human TNF ELISA Kit BD Opteia™ ) para perfazer sempre um volume de 100 $\mu$ l/poço.

### **Procedimento para a quantificação de IL-1 beta**

Os reagentes foram retirados da geladeira e deixados à temperatura ambiente (18-25°C). Removemos a quantidade de poços necessários para o ensaio e pipetamos 50µl do diluente ELISA em cada um deles. Adicionamos os 100µl do padrão e/ou amostras de tecido, já diluídos com o diluente ELISA nos poços apropriados e deixamos incubar por duas horas à temperatura ambiente, coberto com o selo do Kit.

Duas horas após, o conteúdo dos poços foram aspirados e lavados por cinco vezes. Em todas as lavagens e por poço usamos 300µl do *concentrado de lavagem (solução de detergente concentrado com 0,02% thimerosal como conservante)*. Aplicamos 100 µl do *detector de antígeno (anticorpo policlonal biotinilado anti-humano IL-1 betacom 0,15% ProClin-150 como conservante)* por poço. Cobrimos com o selo e deixamos incubar por uma hora a temperatura ambiente.

Uma hora após, o conteúdo dos poços foram aspirados e lavados por cinco vezes. Adicionamos 100µl da *enzima reagente (enzima diluente – proteína tamponada com 0,15% Pro-Clin-150 com o conservante com enzima concentrada – concentrado de avidina peroxidase conjugada com 0,01% timerosal como conservante)*, que foi preparada quinze minutos antes. Cobrimos com o selo e deixamos incubar trinta minutos à temperatura ambiente. Trinta minutos após, os conteúdos dos poços foram aspirados e lavados por sete vezes. Adicionamos 100µl de TMB (3,3', 5,5' – tetramethylbenzidina em solução tamponada) por poço.

Deixamos incubar por trinta minutos a temperatura ambiente no escuro. Trinta minutos após adicionamos 50µl da solução para interromper a reação (ácido fosfórico 1M).

Fizemos a leitura à 450nm no prazo de trinta minutos. O equipamento utilizado foi o Packard (modelo Spectracount™) da Canberra Company. Através de uma escala Di-Log a concentração de citocinas foi analisada em cada amostra. Os ensaios foram sempre efetuados em duplicata e o resultado de cada ensaio representou sempre a média dos 2 ensaios. As concentrações foram expressas em pg/ml de amostra.

#### **Procedimento para quantificação de TNF $\alpha$**

Os reagentes foram retirados da geladeira e deixados à temperatura ambiente (18-25°C). Removemos a quantidade de poços necessários para o ensaio e pipetamos 50µl do diluente ELISA em cada poço. Adicionamos 100µl do padrão e/ou amostras, já diluídos com o diluente ELISA nos poços apropriados e deixamos incubar por duas horas à temperatura ambiente, coberto com o selo do Kit. Duas horas após, o conteúdo dos poços foram aspirados e lavados por cinco vezes. Em todas as lavagens usamos 300µl do *concentrado de lavagem (solução de detergente concentrado com 0,02% thimerosal como conservante)* por poço.

Aplicamos 100 µl do *anticorpo monoclonal biotilado (anti-humano TNF ProClin-150 conjugado com avidina peroxidase com 0,01% timerosal como conservante)*, que foi preparada quinze minutos antes. Cobrimos com o selo e

deixamos incubar uma hora à temperatura ambiente. Uma hora após, o conteúdo dos poços foram aspirados e lavados por sete vezes. Adicionamos 100µl de TMB (3,3', 5,5' – tetramethylbenzidina em solução tamponada) por poço. Deixamos incubar por trinta minutos a temperatura ambiente no escuro. Trinta minutos após adicionamos 50µl da solução para interromper a reação (ácido fosfórico 1M). Fizemos a leitura à 450nm no prazo de trinta minutos.

O equipamento utilizado foi o Packard (modelo Spectracount™) da Canberra Company. Os ensaios foram sempre efetuados em duplicata e o resultado de cada ensaio representou sempre a média dos 2 ensaios. As concentrações foram expressas em pg/ml de amostra.

#### **4.4 MÉTODOS HISTOLÓGICOS**

O tecido da formação hipocampal utilizado foi o corpo do hipocampo, (porções posteriores à cabeça), pois as regiões anteriores foram usadas para ensaios bioquímicos, e por parte da cauda (limite posterior de ressecção). Esse tecido foi fixado em paraformaldeído tamponado a 4°C durante 24 horas. Após a fixação o tecido foi submetido à secção seriada em fatias de 5 mm, no maior eixo da peça, que anatomicamente corresponde ao plano coronal. Estas fatias foram desidratadas em soluções de álcool absoluto, seriadas, para então serem

diafanizadas em solução de xilol puro. Estes preparados então foram embebidos em parafina, liquefeita em temperatura máxima de 60°C, para evitar dano térmico ao tecido e blocos com uma fatia de hipocampo incluso, foram confeccionados.

As secções histológicas foram realizadas em micrótomo Leica em 5 µm e montadas em lâminas de vidro com borda fosca, para a realização das colorações histológicas. Outras secções foram montadas em lâminas de vidro silanizadas e arquivadas, sendo utilizadas para testes de imuno-histoquímica, com marcadores específicos.

#### **Coloração de Hematoxilina e Eosina:**

Os cortes histológicos montados nas lâminas foram desparafinizados em solução de xilol durante 30 minutos. Então foram hidratadas em banhos, de 5 minutos cada, com soluções de álcool absoluto, álcool a 90%, álcool a 80%, álcool a 70%, álcool a 60% e álcool a 50%. Foram imersas em solução de hematoxilina aquosa durante 10 minutos, até que as secções adquirissem coloração violeta.

Procedeu-se à diferenciação em solução de ácido clorídrico alcoólico (solução de diferenciação) até que as secções mudassem a tonalidade para o cinza. Após esta passagem as lâminas voltaram ao álcool absoluto por mais 5 minutos para então serem mergulhadas em solução alcoólica de eosina por 3 minutos. Foram lavadas novamente em álcool absoluto e diafanizadas no xilol para receberem Entelam e cobertura com a lamínula.

### **Coloração pelo Violeta Cresil (Nissl)**

Os cortes histológicos montados nas lâminas foram desparafinizados em solução de xilol durante 30 minutos. Então foram hidratadas em banhos, de 5 minutos cada, com soluções de álcool absoluto, álcool a 90%, álcool a 80%, álcool a 70%, álcool a 60% e álcool a 50%. Então foram imersas em solução de cresil violeta aquoso durante 10 minutos, até que as secções adquirissem coloração violeta escura e foram diferenciadas em água corrente.

Então, foram imersas em álcool absoluto, diafanizadas em xilol para receberem entelam e receberem a lamínula de cobertura.

### **4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA.**

As secções histológicas, montadas em lâminas silanizadas, ficaram por 15 minutos dentro de estufa a 60 °C para melhor adesão do tecido às lâminas. A seguir, as lâminas ficaram 30 minutos em banho de xilol para a remoção da parafina, também em estufa a 60°C. Então foram hidratadas em banhos, de 3 minutos cada, com soluções de álcool absoluto, álcool a 90%, álcool a 80%, álcool a 70%, álcool a 60%, álcool a 50% e um último banho em PBS.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em água oxigenada a 10% em PBS, sendo o tecido lavado três vezes em PBS. A recuperação antigênica foi feita em tampão Tris HCl 0,05 M em pH 9,5 em micro-ondas durante 6 minutos, em potência máxima.

As lâminas foram novamente lavadas três vezes em PBS para a realização do bloqueio da biotina endógena. A seguir, as lâminas foram incubadas com leite em pó integral a 5%, diluído em PBS com Triton X a 0,3%. Os preparados ficaram em repouso por 3 horas.

O anticorpo primário (anti-TNF $\alpha$  ou IL1 $\beta$  do kit de ELISA da BD Bioscience; anti-CD 45 da DAKO, clone PD7/26) foi diluído em leite Molico a 2% em 10 ml de PBS, de modo a se obter as concentrações de 1: 25, 1:50 e 1:100, para o TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  e 1:500 para o anti-CD45 e então incubados com o tecido cerebral por uma noite , em recipiente vedado, a 4°C e ao abrigo da luz.

A seguir as lâminas foram lavadas três vezes em PBS e foi aplicado o anticorpo secundário (BD Bioscience), diluído em leite em pó integral a 2% em 10 ml de PBS, de modo a se obter a concentração de 1:50 para então ser incubado com o tecido por 2 horas, em temperatura ambiente, e lavados por três vezes em PBS.

A revelação do complexo antígeno-anticorpo foi feita com kit ABC (10 $\mu$ l de solução A e 10 $\mu$ l de solução B, diluídos em 10 ml de PBS) em incubação por uma hora e meia. As lâminas foram lavadas duas vezes no PBS e uma vez no TRIS pH

7,5 e reveladas com uma solução de diaminobenzidina (DAB) (10 mg/ 15 ml de TRIS HCl pH 7,5, filtrada). Adicionou-se então 15µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 4 minutos, lavando-se após este período em TRIS HCl pH 7,5.

As lâminas foram então desidratadas em soluções alcoólicas de concentração ascendente em banhos de 5 minutos com: álcool a 50%, álcool a 60%, álcool a 70%, álcool a 80%, álcool a 90%, álcool absoluto, para serem diafanizadas em duas soluções de xilol. As lâminas foram montadas com lamínulas e Enthelan®, não sendo realizada contra-coloração com hematoxilina para TNF $\alpha$  ou IL1 $\beta$  e realizando-se a contra-coloração com hematoxilina para o CD45.

#### **4.6 CONTROLES**

Os tecidos controles, usados nas quantificações de mediadores inflamatórios e aminoácidos neurotransmissores, vieram de indivíduos selecionados de autópsias, realizadas no INCOR. Esses indivíduos morreram por causas não neurológicas. Foram selecionados os que tiveram menor tempo entre a constatação do óbito e a realização do procedimento de autópsia (menos de 6h). Após a retirada do encéfalo, em bloco, dissecou-se a estrutura hipocampal e esta teve a cabeça separada, para armazenamento, seguindo os mesmos protocolos de armazenamento para as dosagens a serem realizadas, acima referidas.

O corpo e cauda da formação hipocampal foram fixados em formol tamponado e processadas histologicamente, para servirem tanto como controles normais (na histologia convencional) como controles negativos (em técnicas de imuno-histoquímica).

#### **4.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO**

O procedimento cirúrgico a que foram submetidos os pacientes foi a corticoamigdalohipocampectomia, realizada pela equipe de neurocirurgia da Unidade de Pesquisa e Tratamento das Epilepsias (UNIPETE) do Hospital São Paulo. Este procedimento consiste na retirada de parte do lobo temporal, representada pelos giros temporal médio e inferior, bem como o pólo temporal, seguindo-se a retirada de cerca de 2/3 da amígdala e dos 2/3 anteriores do hipocampo. Tal procedimento foi realizado no centro cirúrgico, sob anestesia geral, com auxílio de neuronavegação, tendo uma duração aproximada de 4 horas.

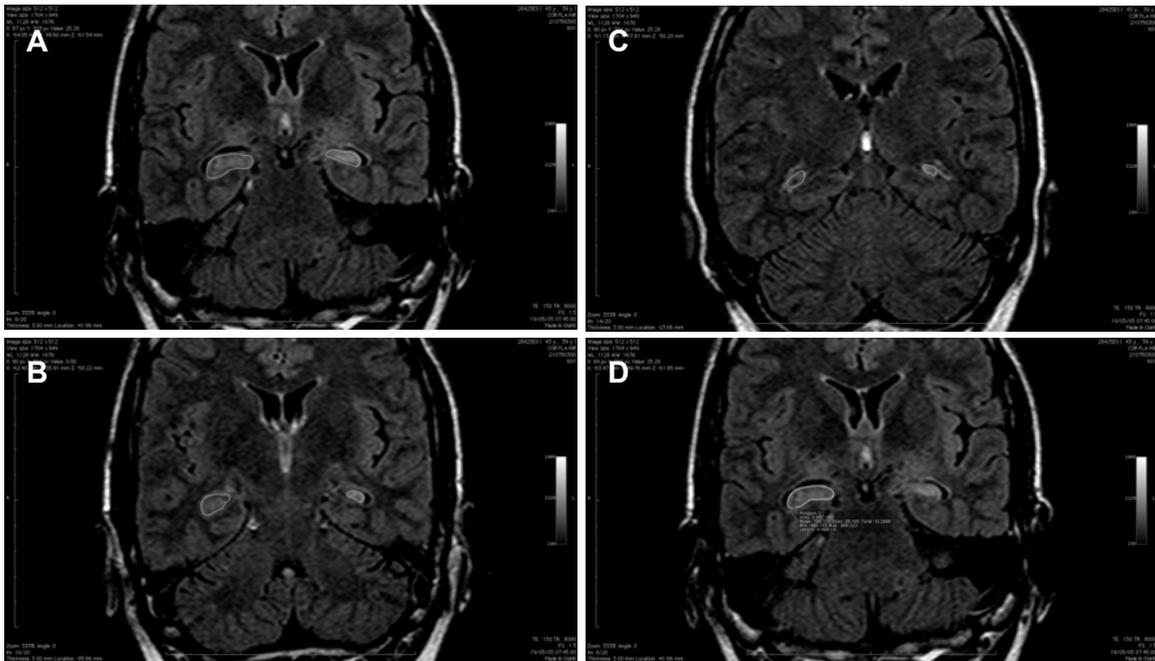
#### **4.8 ANÁLISE DA IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

Os pacientes com diagnóstico clínico e eletrencefalográfico de ELT foram submetidos à RM de encéfalo de alta definição. Os aparelhos utilizados para a

realização foram Gyroscan (Philips Medical System, Eindhoven, Holanda) de 1.5 Tesla e Magnetom Sonata (Siemens AG, Erlangen, Alemanha) de 1.5 Tesla. Os exames foram feitos seguindo o protocolo de avaliação dos lobos temporais, tendo sido analisados pelo mesmo neuro-radiologista, com treinamento em obtenção de imagens em epilepsias.

O protocolo de estudo para os pacientes inclui: seqüência *spin-echo* T1 sagital com 6 mm de espessura, turbo *spin-echo* T2 axial com 6 mm de espessura, FLAIR coronal oblíquo (perpendicular ao eixo longitudinal da formação hipocampal) com 3 mm de espessura, IR-T1 coronal oblíquo (perpendicular ao eixo longitudinal do hipocampo) com 3 mm de espessura. As seqüências FLAIR coronal oblíquo e IR-T1 coronal oblíquo incluíram os lobos temporais em toda a sua extensão.

A análise da intensidade do sinal de cada hipocampo foi medida com o auxílio do programa Leonardo, Syngo MR 2004A (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Alemanha), na seqüência de FLAIR no plano coronal oblíquo, com cortes de 3 mm de espessura e 20% de GAP, realizando-se três medições de cada lado (cabeça, corpo e cauda da formação hipocampal), bem como do tegmento da ponte e do centro do corpo caloso, para servirem de controles internos. **FIGURA 9**



**FIGURA 9:** Exemplo da quantificação do sinal da RM em FLAIR em ambas as cabeças, corpos e caudas do hipocampo, paciente 2. **A)** Marcação da cabeça. **B)** Marcação do corpo. **C)** Marcação da cauda. **D)** Quantificação do sinal da cabeça à direita (734,2).

## 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de todas as informações coletadas nesta pesquisa foi inicialmente feita de forma descritiva.

Para a idade, idade de início da doença, duração, concentração de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e NO dos indivíduos foram calculadas algumas medidas-resumo, como média, valor mínimo, valor máximo, desvio-padrão, e confeccionados gráficos do tipo *boxplot* e diagrama de dispersão (Bussab and Morettin, 2006).

As informações sobre gênero, evento precipitante inicial, lado comprometido, alteração (hipersinal) do pólo temporal e escala de Engel foram analisadas através do cálculo de freqüências absolutas e relativas (%), além da construção de gráficos de barras (Bussab and Morettin, 2006).

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram:

- Teste exato de Fisher (Agresti, 1990) para o estudo da associação entre Gênero e Grupo;
- Teste de Kolmogorov-Smirnov (Siegel, 2006) para verificar se as informações do IL1 beta, TNF alfa, NO, valores normalizados da cabeça, corpo e cauda do hipocampo nos lados comprometido e contralateral, seguiam uma distribuição normal;

- Teste de Levene (Neter et al., 1996) para verificar se as informações da IL1 beta, TNF alfa, NO apresentavam a mesma variância (homocedasticidade) entre os Grupos;
- Teste t-Student para amostra independentes (Neter et al., 1996) na comparação:
  - Dos valores médios de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e NO entre os grupos de pacientes e controle de autopsia.
- Estimativa do coeficiente de correlação linear de Pearson (Bussab and Morettin, 2006) para quantificar a relação linear entre:
  - valores normalizados de RM da cabeça, corpo e cauda do hipocampo entre os lados comprometido e contralateral;
  - valores normalizados de RM da cabeça, corpo e cauda do hipocampo as concentrações de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e NO.

Em todas as conclusões obtidas através das análises inferenciais foi utilizado o nível de significância  $\alpha$  igual a 5%.

Os dados foram digitados em planilhas do Excel 2007 for Windows para o adequado armazenamento das informações. As análises estatísticas foram realizadas com o software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 11.0 for Windows.

#### **4.10 CLASSIFICAÇÃO DE ENGEL**

Os pacientes operados no serviço da UNIPETE são seguidos no ambulatório do serviço. O estado com relação à presença de crises epiléticas e auras é avaliado a cada consulta. Os prontuários foram revisados em dezembro de 2008 para que os diferentes graus de ENGEL fosse estabelecidos para cada paciente, o que proporcionou um seguimento mínimo de um ano e três meses e máximo de dois anos e três meses.

A equipe que acompanhou os pacientes durante o tratamento é constituída por médicos do corpo clínico especialistas e médicos em treinamento, sob orientação.

A classificação proposta por ENGEL (Engel et al., 1993):

Classe I. Livre de crises incapacitantes

A. Completamente livre desde a cirurgia;

B. Crises parciais simples não

incapacitantes desde a  
cirurgia;

C. Algumas crises incapacitantes após a  
cirurgia, mas livre

de crises incapacitantes por > 2 anos;

D. Crises generalizadas com

descontinuidade de DAE

apenas.

Classe II. Crises incapacitantes raras

A. Inicialmente livre de crises

incapacitantes, mas ainda

apresenta raras crises;

B. Raras crises incapacitantes desde a  
cirurgia;

C. Crises incapacitantes ocasionais  
desde a cirurgia, mas  
crises raras nos últimos 2 anos.

Classe III. Melhora evidente

A. Redução evidente das crises;

B. Intervalos prolongados livre de crises  
somando mais de  
50% do período de seguimento, mas  
inferior há 2 anos.

Classe IV. Sem melhora evidente

A. Redução significativa das crises;

B. Sem alteração evidenciada;

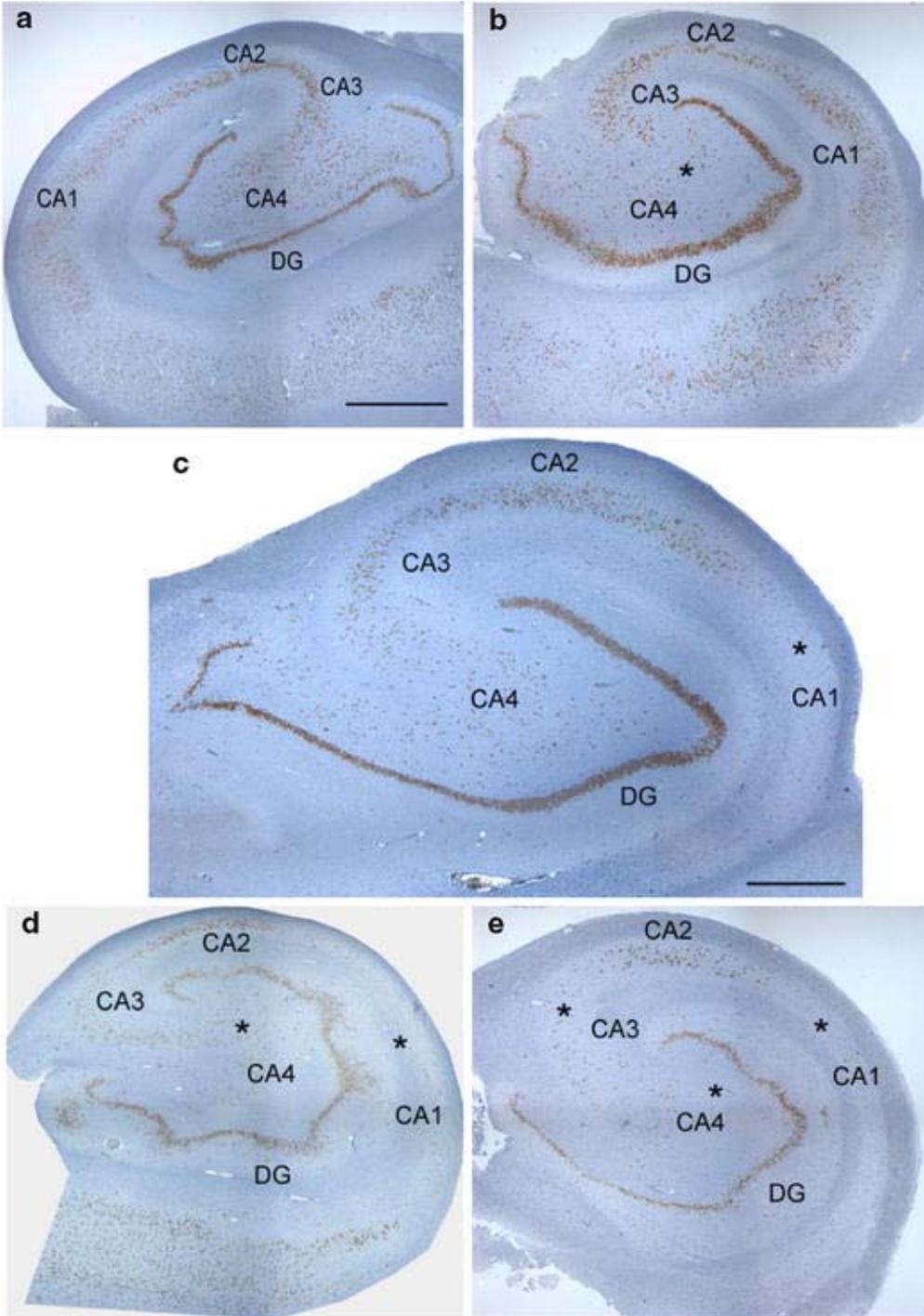
C. Piora das crises.

#### 4.11 ANÁLISE HISOTLÓGICA

Os preparados histológicos foram analisado em microscopia óptica de rotina, sempre pelo mesmo patologista em duas ocasiões diferentes, onde as lâminas foram marcadas apenas com a numeração interna. As imagens foram capturadas no sistema APERIO (APERIO, Vista CA, USA).

Para a classificação do tipo de esclerose segundo Blumcke (Blumcke et al., 2007) foram considerados apenas os hipocampos que tinham todos os segmentos conservados, os que tinham algum tipo de trauma cirúrgico que impossibilitasse a avaliação de todos os seus setores não foram classificados. Devido ao fato que não há descrição exata dos pontos de corte para cada tipo de esclerose, o tipo de esclerose foi cunhada segundo o predomínio da perda celular, assemelhando-se a alguma das imagens propostas por Blumcke (Blumcke et al., 2007).

Os padrões de perda referidos como esclerose clássica foram os tipo Ia e Ib, enquanto os demais foram referidos como esclerose atípica (tipos II e III), conforme o publicado por Blumcke em seu artigo original (Blumcke et al., 2007); vide **FIGURA 10**.



**FIGURA 11:** Achados histopatológicos em pacientes com EMT. **A** Sem EMT, **B** EMT tipo 3 (esclerose do *end folium*), **C** EMT tipo 2 (esclerose de CA1), **D** EMT tipo Ia (esclerose hipocampal clássica), **E** EMT tipo Ib (esclerose hipocampal severa). Barra 1 mm. Asteriscos mostram as regiões de perda celular. Extraído de Blumcke et al.2007.

Devido ao pequeno número de pacientes analisados eventualmente optou-se por aglutinar os pacientes com esclerose tipo I em um único grupo enquanto os demais pacientes constituíram um outro grupo. Nenhum dos pacientes controle (provenientes de autópsias) tinham qualquer indício de perda neuronal do hipocampo na microscopia convencional.

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS.

A amostra selecionada nesta pesquisa foi composta por 39 indivíduos, sendo 29 pacientes (74,35%) e 10 controles de autópsia (25,64%) (tabelas 1 e 2, respectivamente).

O Grupo paciente foi composto por 21 mulheres (72,4%) e 8 homens (27,6%) enquanto o grupo controle de autópsia foi constituído também por 6 mulheres (60,0%) e 4 homens (40,0%) (ver Tabela 3). É importante salientar que a distribuição dos indivíduos quanto ao gênero foi estatisticamente a mesma entre os grupos (pacientes e controles) ( $p=0,763$ ).

**Tabela 1: Características clínicas dos pacientes.**

N°	Sexo	Idade	IPI	Início	Duração	Lado	T.Pa	Engel	TIPO
1	F	38	+	10	28	E	-	IB	-
2	M	39	+	7	32	E	+	IA	-
3	F	38	+	26	12	E	+	IA	-
4	M	28	-	25	3	E	-	IIIA	IA
5	F	38	-	7	31	E	+	IA	IB
6	M	28	+	14	14	D	-	IA	IB
7	F	29	+	24	5	E	-	IA	IB
8	F	31	+	15	16	D	-	IVA	-
9	F	19	-	8	11	E	+	IA	IA

N°	Sexo	Idade	IPI	Início	Duração	Lado	T.Pa	Engel	TIPO
10	F	20	-	15	5	E	-	IIIA	AT
11	M	39	-	15	14	E	+	IA	IB
12	F	39	-	22	17	E	-	IA	AT
13	M	41	+	23	18	D	-	IVC	IB
14	M	46	+	12	34	E	-	IIIA	IB
15	F	30	-	5	25	E	+	IIIB	IA
16	M	38	-	33	5	D	-	IIIA	-
17	M	32	-	7	25	E	-	IB	IA
18	F	26	-	21	5	E	-	IA	-
19	F	30	-	8	22	D	+	IIIA	IA
20	F	41	-	1,5	40	E	-	IA	IA
21	F	39	-	26	13	E	-	IIIA	AT
22	F	51	+	16	35	E	-	IA	-
23	F	35	+	7	28	D	-	IA	-
24	F	31	+	0,8	30	D	-	IA	IB
25	F	48	-	6	42	E	-	IA	-
26	F	56	-	27	29	E	-	IIIA	AT
27	F	44	-	13	31	E	-	IB	-
28	F	46	-	23	23	E	-	IA	IA
29	F	49	-	7	42	D	+	IA	-

Onde: IPI – Evento precipitante inicial; T.Pa: Hipersinal temporopolar; Engel: grau na escala de Engel; Tipo: tipo de EH conforme a classificação de (Blumcke et al., 2007); IA – tipo IA; IB – tipo IB; AT – EH atípica. Idades em anos, bem como duração e início da epilepsia.

**Tabela 2: Grupo controle de autópsia.**

Controle	IDADE	SEXO
1	84	M
2	72	F
3	38	F
4	67	M
5	77	F
6	76	M
7	69	F
8	70	M
9	59	F
10	60	F

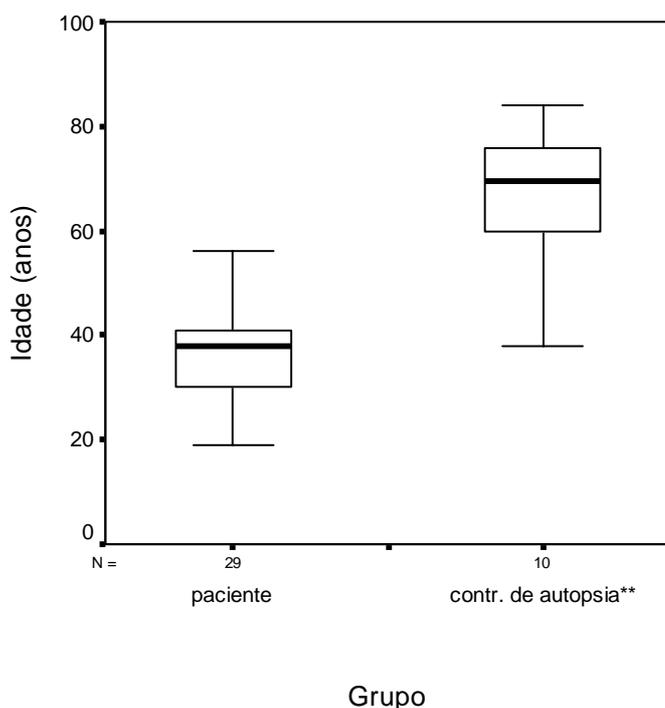
**Tabela 3: Distribuição dos indivíduos, segundo Gênero e Grupo.**

Grupo	Gênero		Total
	Feminino	Masculino	
Pacientes	21	8	29
	72,4%	27,6%	100,0%
Controle de ressonância	6	4	10
	60,0%	40,0%	100,0%
Controle de autópsia	6	4	10
	60,0%	40,0%	100,0%
Total	33	16	49
	67,3%	32,7%	100,0%

A idade média e desvio-padrão dos indivíduos do Grupo dos paciente foi de  $36,9 \pm 9$  anos, variando de 19 a 56 anos, o grupo controle de autópsia apresentou

idade média e desvio padrão de  $67,2 \pm 12,7$  anos, variando de 38 a 84 anos (ver Figura 11). Não houve diferença estatística entre ambos os grupos ( $p = 0,433$ ).

**Figura 11: Comparação da Idade (anos) dos indivíduos, segundo Grupos.**

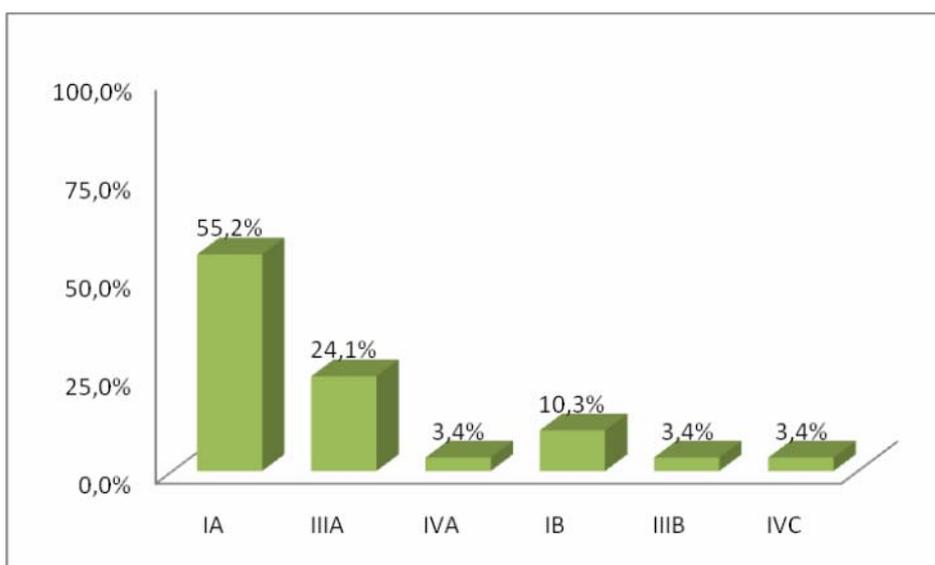


Os pacientes apresentaram idade média de início da doença igual a  $14,6 \pm 8,7$  anos, variando de 1 a 33 anos. A duração média da doença neste grupo foi de  $21,9 \pm 11,8$  anos, variando de 3 a 42 anos. O lado comprometido com mais frequência foi o esquerdo, com 21 (72,4%) pacientes. Cerca de oito (27,6%) pacientes apresentaram alterações de sinal temporopolares, enquanto que 21 (72,4%) pacientes não apresentaram alterações. As informações do prognóstico cirúrgico de acordo com a classificação de Engel dos pacientes estão resumidas na Tabela 4 e na Figura 12.

**Tabela 4: Distribuição da classificação de Engel dos pacientes.**

Engel	Frequência	Porcentagem
IA	16	55,2%
IIIA	7	24,1%
IVA	1	3,4%
IB	3	10,3%
IIIB	1	3,4%
IVC	1	3,4%
Total	29	100,0%

**Figura 12: Distribuição da classificação de Engel dos pacientes em porcentagem.**



## **6.2 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS E NO NOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE.**

As informações sobre concentração de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e NO dos indivíduos dos grupos de pacientes e controle de autopsia estão resumidas na Tabela 5 e

nas Figuras 13 a 15. É importante ressaltar que o grupo dos pacientes apresentou valores médios do IL1 $\beta$  (p=0,023) e TNF $\alpha$  (p=0,049) maiores que o Grupo controle de autópsia. O NO médio do Grupo paciente foi estatisticamente igual ao NO médio do Grupo controle de autópsia (p=0,150).

As informações de TNF $\alpha$  e NO dos indivíduos entre os Grupos apresentaram homocedasticidade (igualdade de variâncias). A distribuição normal foi evidenciada nas informações do IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e NO.

**Tabela 5: Medidas-resumo das concentrações de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  (em pg/ml) e NO (em  $\mu$ M/mg), segundo Grupo.**

Grupo	medidas-resumo	IL1 $\beta$	TNF $\alpha$	NO
Paciente	N	29	29	28
	média	117,6	28,9	27,4
	mínimo	91,6	10,1	11,5
	máximo	155,4	60,1	71,4
	desvio-padrão	15,4	14,5	14,0
controle de autópsia	N	10	10	10
	média	92,3	17,8	34,6
	mínimo	70,3	6,0	22,4
	máximo	150,0	53,8	62,6
	desvio-padrão	28,8	16,1	11,2

Figura 13: Comparação da concentração de IL1 $\beta$  (em pg/ml) no HPC de pacientes e controles (p=0,023).

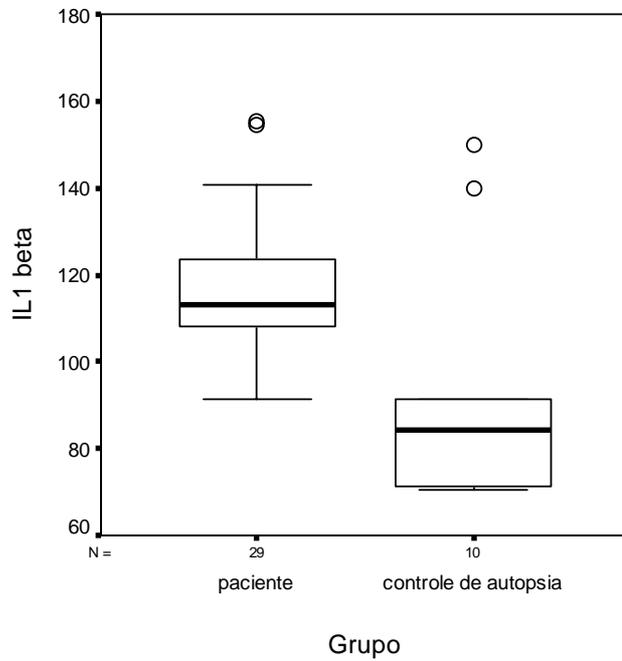
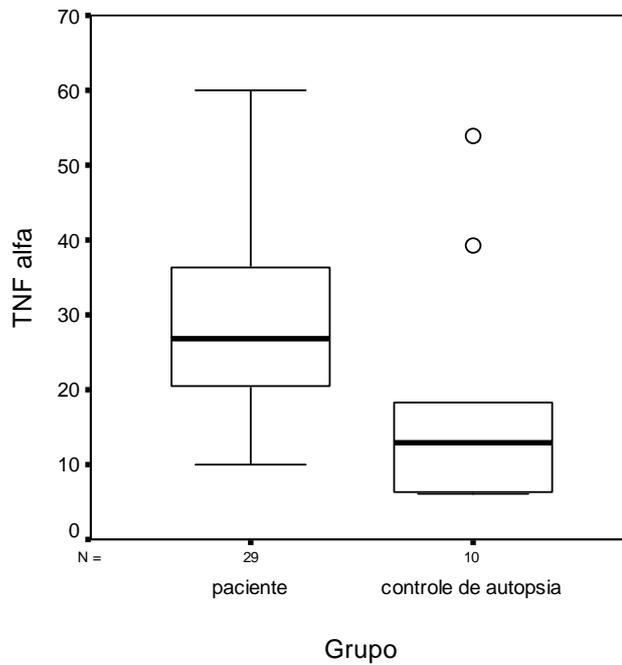
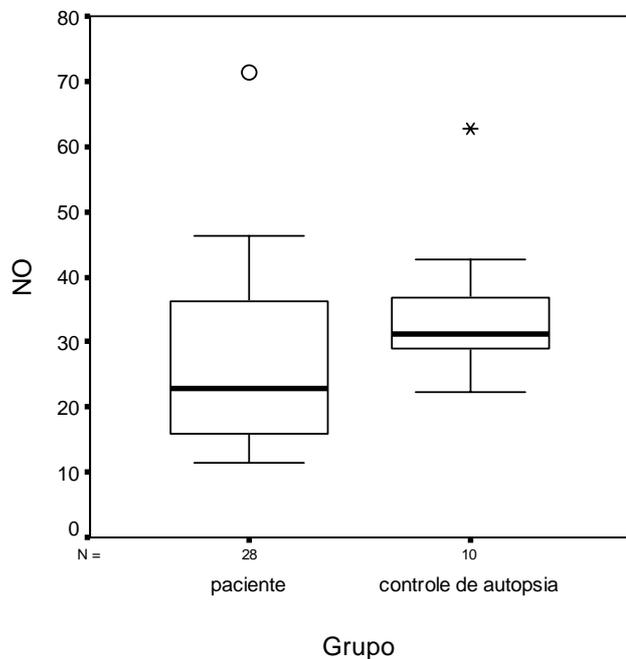


Figura 14: Comparação da concentração de TNF $\alpha$  (em pg/ml) no HPC de pacientes e controles (p=0,049).



**Figura 15: Comparação da concentração de NO (em  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ) no HPC de pacientes e controles ( $p=0,15$ ).**



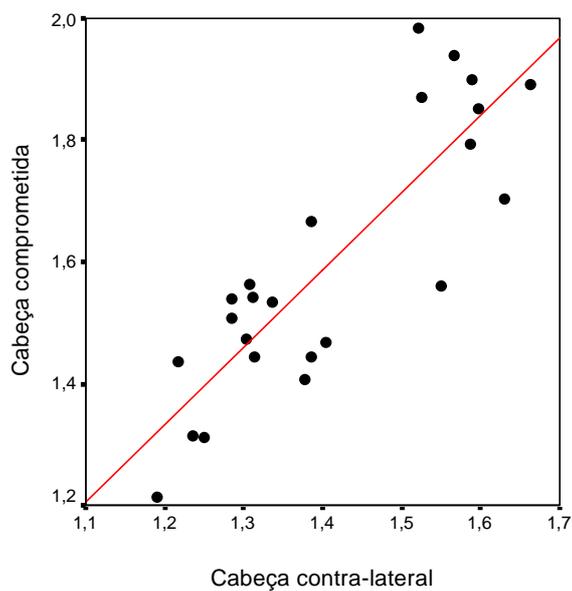
### **5.3- CORRELAÇÃO DO SINAL OBTIDO NA RM DO HIPOCAMPO COMPROMETIDO E CONTRA-LATERAL.**

As informações dos valores normalizados da Cabeça, Corpo e Cauda do lado comprometido dos pacientes foram correlacionadas aos valores da Cabeça, Corpo e Cauda do lado contralateral, conforme trazem as figuras 17 a 19. As evidências apresentadas nas figuras 16 a 18 são confirmadas com os valores dos coeficientes de correlação linear de Pearson (ver Tabela 6), em que concluímos que há correlação linear crescente entre os valores da Cabeça, Corpo e Cauda do lado comprometido e o lado contralateral. Vale dizer que valores normalizados da

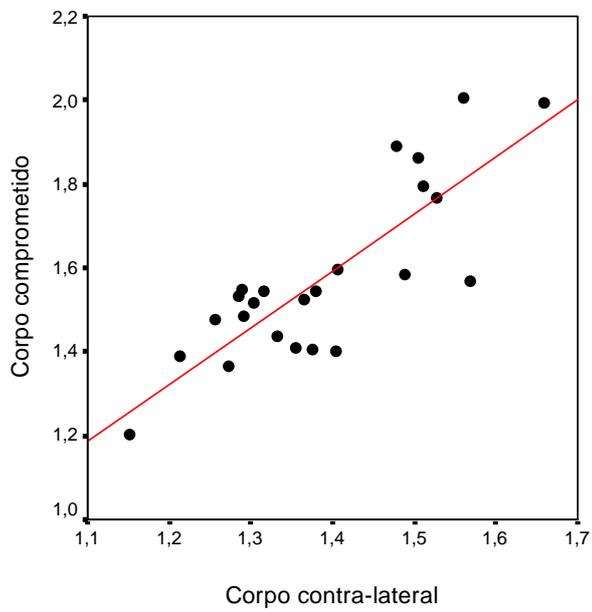
Cabeça, Corpo e Cauda dos lados comprometido e contralateral seguem uma distribuição normal.

As figuras 16, 17 e 18 mostram os resultados obtidos quando os sinais obtidos na RM do lado comprometido era comparado ao contralateral.

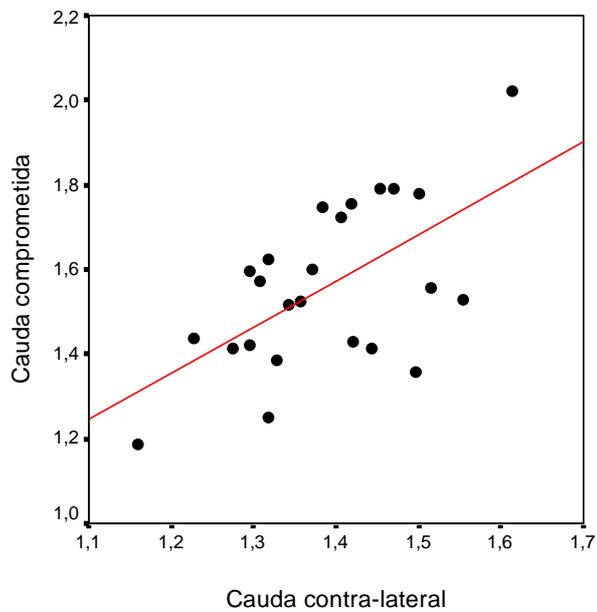
**Figura 16: Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipsinal da cabeça do hipocampo comprometido e contralateral.**



**Figura 17: Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal do corpo do hipocampo comprometido e contralateral.**



**Figura 18: Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal da cauda do hipocampo comprometido e contra-lateral.**



**Tabela 6: Coeficientes de correlação linear de Pearson entre os valores da Cabeça, Corpo e Cauda do hipocampo do lado comprometido e o lado contralateral.**

	Coeficiente de Pearson	p
Cabeça comprometida e Cabeça contralateral	0,854	<0,001
Corpo comprometido e Corpo contralateral	0,829	<0,001
Cauda comprometida e Cauda contralateral	0,602	0,002

Como evidenciado, existe uma correlação positiva entre o sinal de esclerose do hipocampo comprometido (hipersinal) versus o hipocampo contralateral, mostrando comprometimento bilateral dessa estrutura.

#### **5.4- CORRELAÇÃO ENTRE HIPERSINAL DO HIPOCAMPO NA RM E CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS E NO.**

O estudo da correlação entre os valores normalizados da Cabeça, Corpo e Cauda do lado comprometido dos pacientes e IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e NO, também foi objeto de estudo desta pesquisa. As figuras de 19 a 27 mostram o comportamento conjunto destas informações.

Conforme sugerem as figuras 19 a 27, detectamos, através da estimação dos coeficientes de correlação linear de Pearson, uma correlação positiva entre os valores normalizados da RM da Cabeça, Corpo e Cauda do hipocampo do lado

comprometido com NO. Houve também uma correlação positiva entre intensidade de sinal na cauda do hipocampo e concentração de IL1 $\beta$  (ver Tabela 8). Não houve correlação positiva entre IL1 $\beta$  e hipersinal da RM entre cabeça e corpo do hipocampo. Igualmente, não houve correlação positiva entre hipersinal no hipocampo (cabeça, corpo e cauda) e concentrações de TNF $\alpha$ . Os valores de significância podem ser visualizados na tabela 7.

**Figura 19:** Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados de hipersinal da cabeça do hipocampo do lado comprometido e IL1 $\beta$  (em pg/ml).

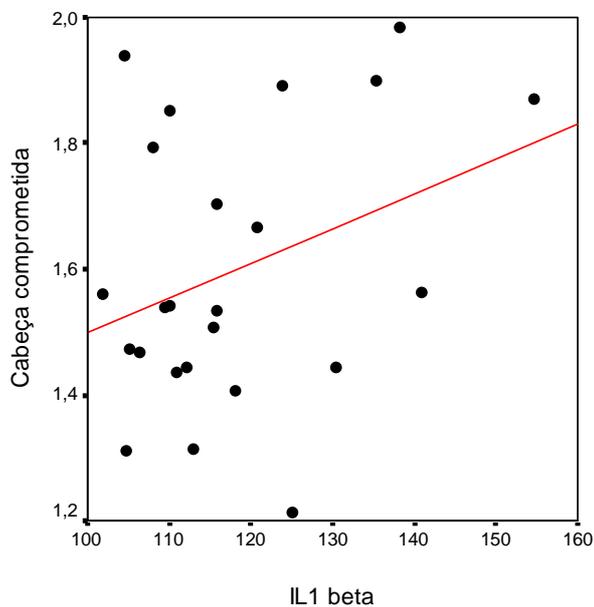


Figura 20: Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal da cabeça do hipocampo do lado comprometido e TNF $\alpha$  (em pg/ml).

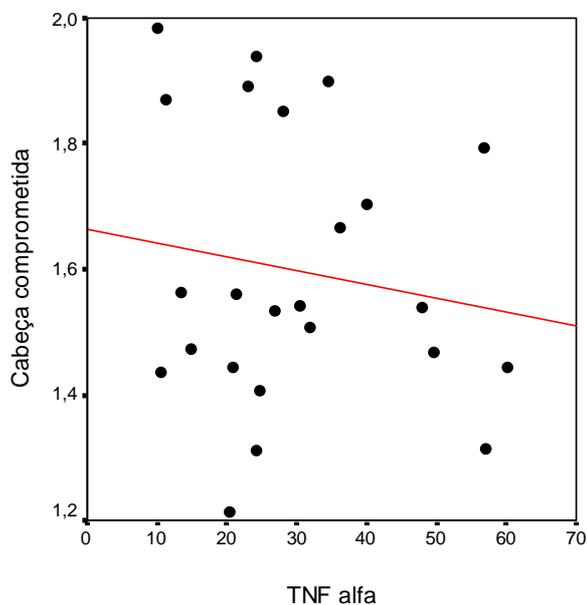


Figura 21: Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados de hipersinal da cabeça do hipocampo do lado comprometido e NO (em  $\mu$ M/mg).

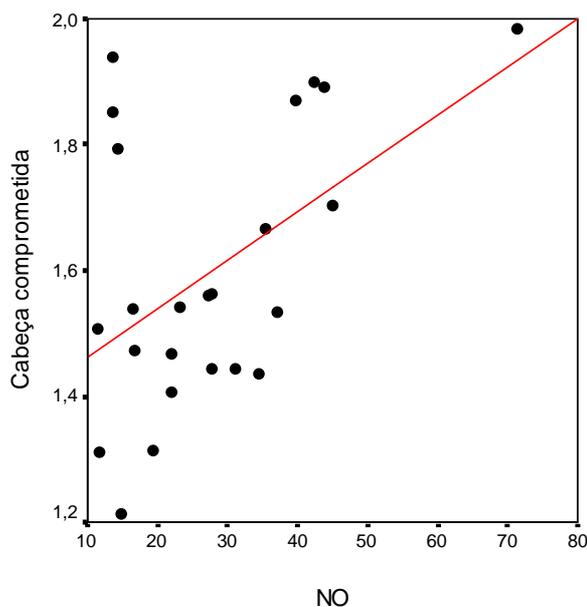


Figura 22: Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal do corpo do hipocampo do lado comprometido e IL1 $\beta$  (em pg/ml).

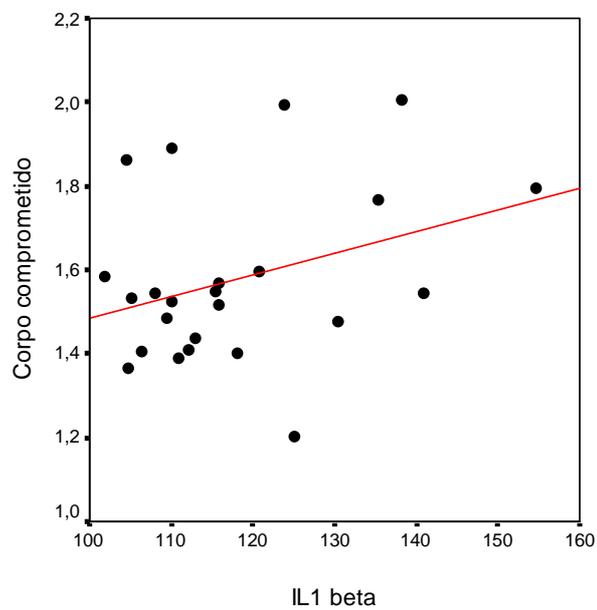


Figura 23: Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal do corpo hipocampo do lado comprometido e TNF $\alpha$  (em pg/ml).

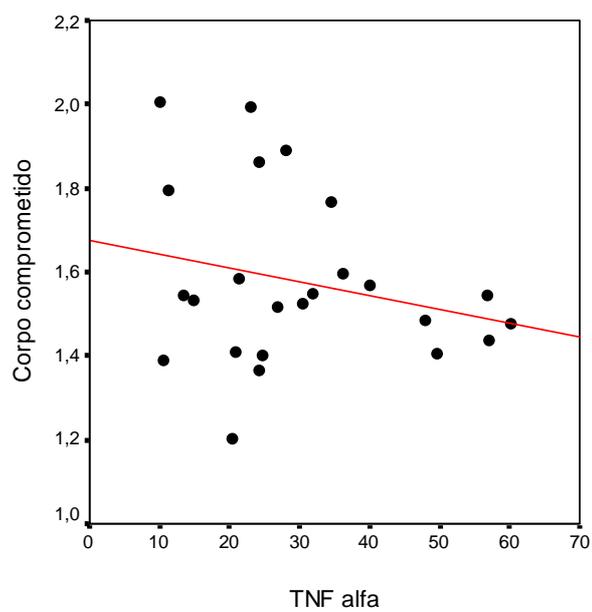


Figura 24: Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal do corpo do hipocampo do lado comprometido e NO (em  $\mu\text{M}/\text{mg}$ ).

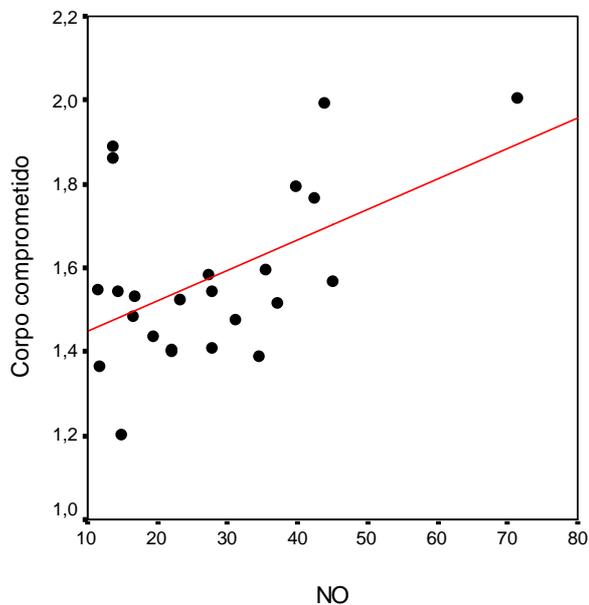


Figura 25: Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal da cauda do hipocampo do lado comprometido e IL1 $\beta$  (em  $\text{pg}/\text{ml}$ ).

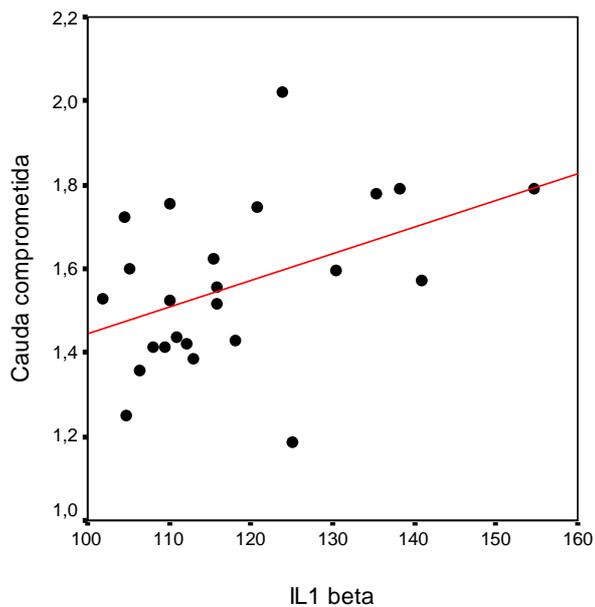


Figura 26: Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal da cauda do hipocampo do lado comprometido e TNF $\alpha$  (em pg/ml).

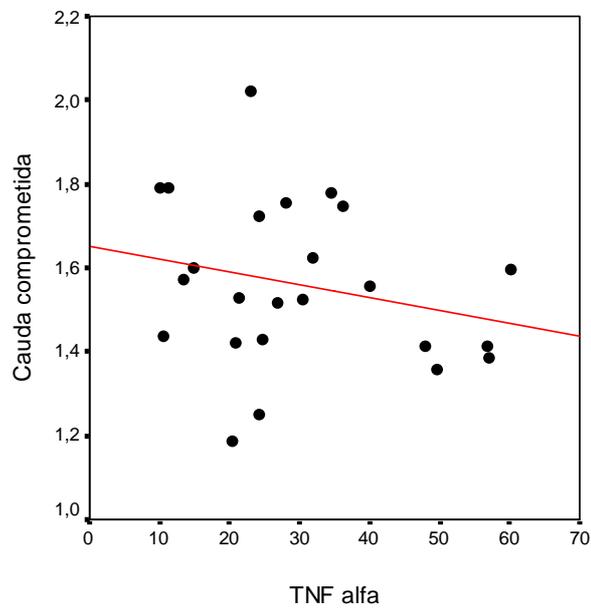
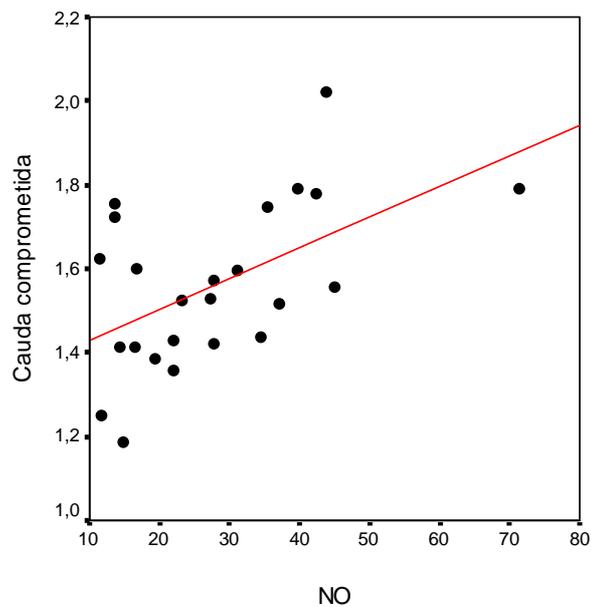


Figura 27: Distribuição dos pacientes, segundo valores normalizados do hipersinal da cauda do hipocampo do lado comprometido e NO (em  $\mu$ M/ml).



**Tabela 7: Coeficientes de correlação linear de Pearson entre os valores da cabeça, corpo e cauda do hipocampo do lado comprometido e IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e NO.**

	Coeficiente	p
Cabeça comprometida e IL1 $\beta$	0,338	0,106
Cabeça comprometida e TNF $\alpha$	-0,149	0,486
Cabeça comprometida e NO	0,498	<b>0,013</b>
Corpo comprometido e IL1 $\beta$	0,337	0,107
Corpo comprometido e TNF $\alpha$	-0,243	0,253
Corpo comprometido e NO	0,505	<b>0,012</b>
Cauda comprometida e IL1 $\beta$	0,436	<b>0,033</b>
Cauda comprometida e TNF $\alpha$	-0,237	0,265
Cauda comprometida e NO	0,532	<b>0,007</b>

#### **5.5- COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLU E GABA NO HIPOCAMPO DOS GRUPOS PACIENTE E CONTROLE.**

As informações, referentes à concentração de glutamato (GLU) e GABA dos indivíduos do grupo de paciente com ELT e controle de autópsia, estão resumidas na Tabela 8 e nas figuras 28 e 29. É importante ressaltar que o Grupo dos pacientes apresentou valores médios do GLU ( $p= 0,00051$ ) e GABA ( $p= 0,0026$ ) menores que o Grupo controle de autópsia. Esses dados sugerem maior consumo desses neurotransmissores nos hipocampos afetados, quando comparados aos controles.