

Abordagem Experimental do Hipocampo Humano Obtido nas Cirurgias para Tratamento de Pacientes com Epilepsia Refratária a Drogas Antiepilépticas

Emilio R. Garrido Sanabria¹

Dominique Lurton²

Eliana Garzon³

Felix Pahl⁴

Eduardo Vellutini⁴

Regina Vianna⁵

Siegrun Gabriel⁶

Américo C. Sakamoto⁷

Elza Márcia T. Yacubian⁸

Esper A. Cavalheiro⁹

- 1 Pós-doutorando, Laboratório de Neurologia Experimental da Escola Paulista de Medicina – Unifesp.
- 2 Especialista em Neurologia, Pós-graduando (Doutorado) em Neurociências, Neurologia, da Escola Paulista de Medicina – Unifesp.
- 3 Especialista em Neurologia.
- 4 Especialista em Neurocirurgia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo.
- 5 Especialista em Neuropatologia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo.
- 6 Professora de Fisiologia da Humboldt University, Berlim.
- 7 Faculdade de Medicina da USP, Ribeirão Preto, Centro de Epilepsia de São Paulo – Hospital Alemão Oswaldo Cruz.
- 8 Neurologista do Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo, Centro de Epilepsia de São Paulo do Hospital Alemão Oswaldo Cruz.
- 9 Professor Titular do Departamento de Neurologia-Neurocirurgia da Escola Paulista de Medicina – Unifesp.

RESUMO

Alguns pacientes que apresentam epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso beneficiam-se da remoção cirúrgica do foco epileptogênico. O estudo das alterações eletrofisiológicas e neuropatológicas no tecido epiléptico humano é fundamental para a compreensão dos mecanismos fisiopatogênicos e o desenvolvimento de novas drogas antiepilépticas e outras modalidades terapêuticas. A esclerose mesial temporal, lesão responsável por cerca de 65% das epilepsias do adulto, cursa com grau elevado de intratabilidade. Nela as estruturas mediais do lobo temporal, principalmente o hipocampo, participam ativamente na gênese das descargas epileptiformes. No presente trabalho, abordaremos algumas das técnicas que estão sendo atualmente utilizadas para estudo da epileptogênese na epilepsia do lobo temporal. O tecido epiléptico obtido no centro cirúrgico de seis pacientes foi transportado ao laboratório onde foram realizados, além da análise eletrofisiológica *in vitro*, estudos neuropatológico e imunocitoquímico. Essas técnicas permitiram a detecção de anormalidades nos registros eletrofisiológicos sob a forma de descargas interictais e ictais *in vitro*. Foi verificada heterogeneidade das anormalidades epileptiformes tendo sido possível, ainda, a realização de testes de resistência a drogas antiepilépticas utilizadas no tratamento de um desses pacientes. Esses dados indicam que as anormalidades epileptogênicas no tecido humano devem ser complexas e que as mesmas podem ser avaliadas pela abordagem experimental. A compreensão das mesmas pode fornecer novas perspectivas na avaliação pré-cirúrgica e no tratamento dessa forma de epilepsia.

UNITERMOS

Epileptogênese, hipocampo, eletrofisiologia, neuropatologia.

INTRODUÇÃO

O estudo das bases eletrofisiológicas e moleculares dos processos associados à gênese da atividade bioelétrica anormal no tecido humano epilético é um dos grandes avanços científicos na epileptologia moderna. A realidade atual mostra que um grande número de pacientes epiléticos apresenta epilepsias refratárias às drogas antiepiléticas. Em alguns casos, uma avaliação eletroclínica integral e bem planejada pode levar à identificação das áreas responsáveis pelas descargas epiléticas e a remoção cirúrgica dessas áreas permite controle satisfatório das crises. As causas da epileptogenicidade e intratabilidade são em parte desconhecidas, porém, a resposta a muitas dessas questões pode estar na análise do tecido epilético. A compreensão da fisiopatogênese dos distúrbios epiléticos no tecido humano levará certamente ao desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficazes e racionais.

A abordagem eletrofisiológica das redes neuronais epiléticas do tecido humano tem sido mais difundida nas últimas décadas¹⁻⁵, porém, desde a década de 1950, foram realizados registros extracelulares *in vivo* acoplados ao EEG de superfície que mostraram descargas anormais de neurônios neocorticais em pacientes que estavam sendo avaliados para a remoção cirúrgica da área epileptogênica⁶. Posteriormente, foi verificado que os padrões de descargas elétricas aconteciam em “surto” ou “salvas” (*burst*) e que esse fenômeno estava presente no neocórtex epileptogênico humano⁷. No entanto, os autores observaram que esses padrões nem sempre acompanhavam ou se correlacionavam às descargas observadas no registro de EEG e que existia variabilidade nas propriedades elétricas entre os diferentes tipos de células. Algumas pareciam mais hiperexcitáveis do que outras, porém, existia uma tendência maior à sincronização delas no período que antecedia o início das crises epiléticas⁷. De fato, essas observações, *in vivo* no tecido humano, originaram as duas grandes escolas que, baseadas na eletrofisiologia, tentaram explicar a fisiopatogênese das descargas epiléticas como sendo originadas em um grupo susceptível de neurônios hiperexcitáveis (“teoria do neurônio epilético”) ou em redes neuronais epileptogênicas (“teoria do agregado epilético”)^{8,9}. A primeira sugere que as alterações nas propriedades da membrana transformam neurônios normais em neurônios “epiléticos” que geram, em resposta aos estímulos, em vez de um único potencial de ação, um grupo deles, sob a forma de surtos de potenciais de ação funcionando como marca-passo e sincronizando os outros neurônios da rede neuronal promovendo um estado de hiperexcitabilidade, originando as descargas epiléticas.

A segunda, chamada “teoria da rede neuronal epilética” postula que para a formação da área epileptogênica há necessidade de alterações nos circuitos neuronais (“circuitos epiléticos”) como, por exemplo, a ocorrência de reorganização estrutural com formação de circuitos recorrentes excitatórios (mediados por glutamato), interconexões sinápticas excitatórias anormais e defeito na transmissão GABAérgica.

Estudos posteriores do grupo de Babb *et al.*¹⁰, utilizando metodologia similar, mostraram que uma pequena proporção de células disparava durante as descargas interictais no EEG de superfície e que um número crescente de células era recrutado nos períodos de transição para crises epiléticas.

Foi ainda caracterizado o correlato intracelular da descarga interictal sob a forma de surtos de potenciais de ação em uma determinada população neuronal¹¹⁻¹³. Essas descargas foram descritas como PDS (*paroxysmal depolarization shift*), grafoelemento característico dos agregados neuronais hiperexcitáveis no foco epileptogênico¹⁴.

Estudo do tecido epilético humano

O estudo do tecido humano espelha-se nos trabalhos pioneiros de Ward *et al.*⁶. A atividade epileptiforme pode ser avaliada *in vivo* por registro vídeo-EEG, eletrocorticografia, estereoEEG ou por registros extracelulares unitários ou de campo elétrico^{15,16}. A análise das propriedades *in vivo* do tecido epilético apresenta vantagens e limitações. Em primeiro lugar, o registro da atividade eletrofisiológica do tecido epilético conectado na complexa circuitaria do cérebro como um todo, permite-nos ter indícios para definir se essa área é realmente a zona epileptogênica ou coincidentemente ictogênica. Da mesma maneira, nos auxilia na caracterização dos padrões interictais ou ictais de determinados tipos de patologias ou de lesões epileptogênicas. No entanto, os aspectos eletrofisiológicos e moleculares que determinam a expressão de hiperexcitabilidade por uma região cerebral e que, conseqüentemente, participem da gênese das descargas anormais, só podem ser apropriadamente estudados *ex-vivo* ou seja, fora do cérebro. Essa abordagem experimental pode ser realizada com várias metodologias descritas a seguir.

Apesar da diversidade das lesões potencialmente epileptogênicas, o neuropatologista conta com técnicas sofisticadas de imunocitoquímica e de biologia molecular (hibridização *in situ*, PCR, etc.), microscopia eletrônica e traçadores de vias neuroanatômicas. O estudo neuropatológico permite a caracterização macro e micros-

cópica do tecido, a avaliação do grau de perda neuronal e reorganização estrutural e os fenômenos associados ao processo de neuroplasticidade crônica pós-lesional. O intuito desse tipo de avaliação é definir marcadores moleculares ou estruturais de epileptogenicidade. Os dados obtidos podem ser então correlacionados com as informações clínicas e eletrofisiológicas obtidas na avaliação pré-cirúrgica dos pacientes epiléticos.

Após a remoção, o tecido deve ser mantido vivo para ser estudado por técnicas microfisiológicas. A viabilidade do tecido é garantida pela utilização de meios artificiais que contêm os principais componentes do líquido cefalorraquiano (LCRa) e este é oxigenado e transportado em temperatura baixa até o laboratório onde é fatiado em espessura de 400 μm a 600 μm , sendo então processada a análise eletrofisiológica *in vivo* pela técnica de registro em fatias cerebrais. Essas fatias permanecem viáveis por até 16 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudamos os tecidos hipocampais de seis pacientes com epilepsia do lobo temporal por esclerose mesial temporal (EMT) refratária à DAE. O diagnóstico de EMT e de intratabilidade medicamentosa foi definido após avaliação clínica e dados de exames complementares estruturais como ressonância magnética do encéfalo e funcionais como EEG interictal e ictal e estudos ictais por tomografia por emissão de fóton único como parte da avaliação pré-cirúrgica de epilepsia. A congruência desses dados permitiu a identificação topográfica da zona epileptogênica em todos os casos. Os dados clínicos dos pacientes encontram-se representados na tabela 1. Estes foram correlacionados com os padrões eletrofisiológicos *in vivo* e anormalidades neuropatológicas (ver diagrama de procedimentos e correlação no gráfico 1). Todos os pacientes foram submetidos a lobectomia temporal com amígdalo-hipocampectomia “em bloco”. Parte do tecido removido foi encaminhada ao setor de neuropatologia visando à identificação de alguns tipos de lesões ou alterações teciduais como perda neuronal e gliose.

Neuropatologia

Os hipocampos foram corados pela técnica de Nissl, destinada à coloração das neurofibrilas específicas dos neurônios pela técnica do cresil violeta (0,5%) e/ou azul de toluidina associado a heptamolibdato de sódio para coloração da substância branca mielinizada e a análise morfológica desses cortes foi efetuada em um micros-

cópio conectado a um aparelho de análise de imagens, usando os recursos do programa NIH-Image (Wayne Rosbad). A determinação da perda neuronal foi realizada em cinco regiões do hipocampo (CA4, CA3, CA2, CA1 e giro denteado) pelo cálculo da densidade celular volumétrica (DCV) com a fórmula geral de correção histológica de Abercrombie¹⁰.

O cálculo da perda neuronal foi realizado por meio da relação simples da DCV e dos valores normais de DCV (nas porções anterior e posterior do hipocampo) obtidos por meio exemplares controles e também por dados da literatura¹⁰.

Fatias de tecido epilético

Uma outra parte do tecido ressecado foi rapidamente submersa em LCRa gasificado e com mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5% de CO₂ e mantida a baixa temperatura (4°C a 5°C) durante o transporte ao laboratório para obtenção das fatias hipocampais. A técnica de fatias cerebrais de tecido humano utilizada foi descrita em trabalhos anteriores¹⁷. Para a obtenção das fatias foi necessário separar um fragmento (6 mm a 8 mm) do corpo do hipocampo (Figura 1). As fatias foram preparadas no plano coronal no qual existe preservação da circuitaria básica hipocampal (áreas CA1, CA2, CA3 e giro denteado). Em seguida as fatias hipocampais foram transferidas para câmara de registros eletrofisiológicos onde permaneceram durante aproximadamente duas horas antes do início da abordagem eletrofisiológica. As figuras 2A e 2B mostram o equipamento no qual são realizados os registros eletrofisiológicos. Os potenciais extracelulares de campo elétrico foram registrados em diferentes áreas hipocampais, porém, no presente trabalho descreveremos os achados observados no giro denteado após estimulação antidrômica realizada nas fibras musgosas localizadas no hilo (parâmetros de estimulação: 0,2 V a 30 V, a 0,1 Hz). A micropipeta para registro extracelular foi preenchida com NaCl 1M (5 Mohms a 10 Mohms) e posicionada na camada granular do giro denteado. Foi realizada exploração detalhada dos potenciais em diferentes locais dele e o sinal bioelétrico foi amplificado (AXOCLAMP2B) e digitalizado para análise *off-line* com programa de registro PCLAMP6.

Estimulação para obtenção de respostas ortodrômicas e antidrômicas

Resposta ortodrômica: um microeletrodo bipolar de arame fino de platina com diâmetro de 100 μm e isolado externamente com teflon foi microposicionado na via perfurante, constituída por fibras excitatórias

TABELA 1
Características clínicas gerais dos pacientes estudados

Caso	Sexo	Idade (anos)	Idade de início das crises (anos)	Tipos e frequência de crises	Drogas antiepilépticas	Alterações no EEG	RNM	SPECT ICTAL	Patologia
HPC 01	M	31	20	CPC com generalização secundária 1 a 2 crises/dia	CBZ OCBZ PB	Descargas interictais e ictais na região temporal esquerda	Atrofia HPC à esquerda	Hiperperfusão do lobo temporal esquerdo	Esclerose hipocampal intensa
HPC 02	M	28	> 25	CPC/ generalização 1 crise/1 a 2 dias	CBZ TPM PB VPA	Descargas interictais na região temporal direita	Atrofia HPC discreta	Hiperperfusão do lobo temporal direito	Esclerose hipocampal moderada
HPC 03	M	35	8-9	CPC 1 crise/7 dias	PB PHT VPA CBZ	Descargas interictais e ictais na região temporal esquerda	Redução do volume + hipersinal HPC à esquerda	Normal	Esclerose hipocampal intensa
HPC 04	M	40	37	CPC + generalização 1 crise/3 a 4 meses	CBZ VPA PHT	Descargas interictais e ritmo teta intermitente temporal esquerda	Atrofia HPC à esquerda	Hiperperfusão temporal mesial esquerda	Esclerose hipocampal intensa
HPC 05	F	28	16	CPC 1 a 2 crises/dia	PB CBZ VPA	Descargas epileptiformes interictais e ictais na região temporal direita	Alteração no sinal do córtex, amígdala e córtex temporal direito	Hiperperfusão em estruturas mesiais temporal direita	Esclerose hipocampal moderada
HPC 06	M	31	6	CPC 1 a 4 crises/dia	CBZ PB VPA	Descargas interictais e ictais na região temporal anterior direita	Alteração no sinal do córtex no nível do úncus, amígdala e atrofia HPC à direita	Hiperperfusão em estruturas mesiais temporal direita	Esclerose hipocampal moderada

CPC: crise parcial complexa; PB: fenobarbital; CBZ: carbamazepina; VPA: ácido valpróico; OCBZ: oxcarbazepina; PHT: fenitoína; TPM: topiramato; RNM: ressonância nuclear magnética; HPC: hipocampo.

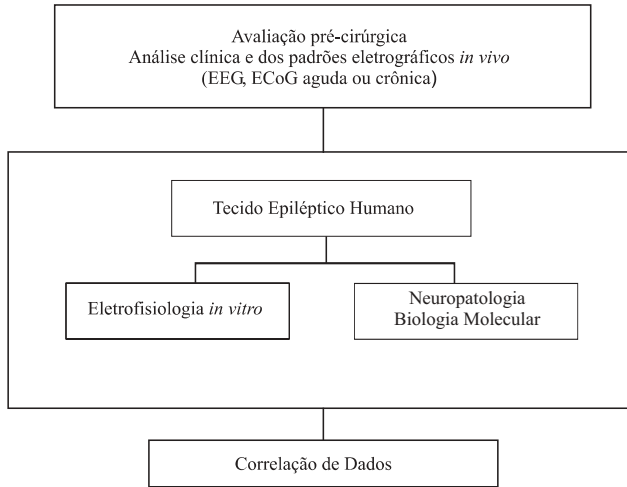


GRÁFICO 1

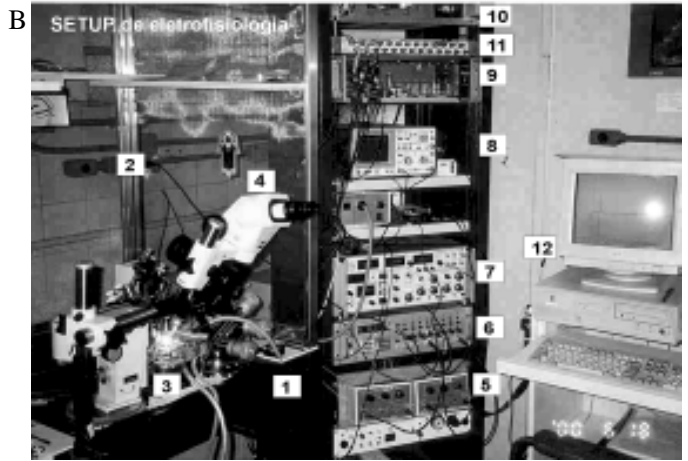
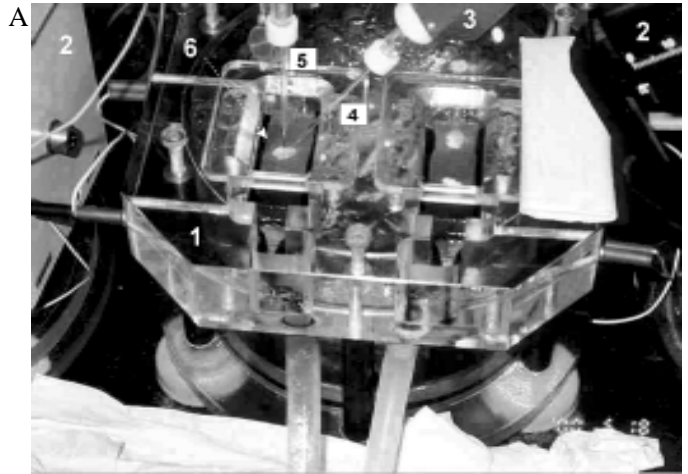


FIGURA 2

Foto ilustrativa de equipamento (SETUP) de eletrofisiologia. Parte A (1) Câmara de registro, (2) micromanipuladores, (3) circuito microamplificador “Headstage”, (4) microeletrodo de registro extracelular, (5) microeletrodo de registro intracelular, (6) fatia cerebral. Parte B – SETUP completo: (1) mesa antivibracional, (2) gaiola de Faraday, (3) câmara de registro, (4) estereomicroscópio STEMI 2000, (5) caixas estimuladoras DS2A, (6) Master-8, (7) amplificador AXOCLAMP-2B, (8) osciloscópio, (9) pré-amplificador diferencial AC-DC, (10) termorregulador da câmara de registro, (11) circuito digitalizador DIGIDATA1200, (12) microcomputador com interface de digitalização e software para aquisição e processamento do sinal.

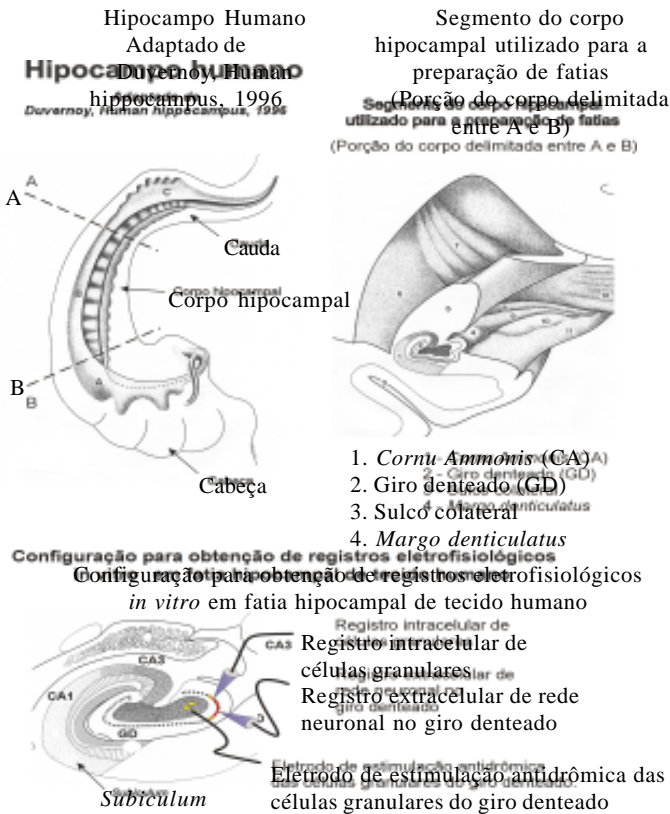


FIGURA 1

glutamatérgicas eferentes do córtex entorrinal (Figura 1). A distância entre o eletrodo de estimulação e o microeletrodo de registro foi de aproximadamente 250 µm em todos os casos. Nessa configuração foram ativadas fibras da via purpurante que produzem o estímulo ortodrômico

em neurônios granulares do giro dentado. Foi aplicado um estímulo de voltagem contínua com duração de 100 ms a 200 ms e frequência de 0,1 Hz usando uma unidade isoladora de estímulos (modelo DS2A, Digitimer, Inc). Sua intensidade variou de 0,2 V a 50 V,

o que permitiu obter informações das respostas sublimi-riais e limi-riais (estímulo mínimo capaz de evocar potenciais de ação) e supralimi-riais (estímulo 20% acima do limiar). Esse tipo de análise é conhecido como *input/output*. Pulsos pareados a intervalos de 20 ms a 200 ms foram deflagrados para testar a inibição por pulsos pareados. As estimulações sublimiar e limiar permitem a ativação de grupos de neurônios principais do giro denteado representados pelas células granulares, a maioria das quais são excitatórias sem estimulação excessiva dos interneurônios locais, como as células em cesto. Se existir alguma anomalia em circuitos inibitórios, ela pode ser revelada por esse protocolo, pois nessas circunstâncias de desinibição a gênese de atividade polissináptica local é facilitada (circuitos recorrentes excitatórios). Ao ser atingido o limiar, a resposta ortodrômica normal intracelular é um potencial de ação que aparece de forma sincrônica com a população de espículas extracelulares. Essa resposta intracelular aparece com uma latência de 2 ms a 4 ms após a estimulação, o que reflete a ativação de mecanismos sinápticos na gênese desta.

Resposta antidrômica: estímulos de características semelhantes às descritas anteriormente foram aplicados por meio de outro microeletrodo posicionado superficialmente no hilo do giro denteado. Nessa configuração, são ativadas antidrômica-mente fibras musgosas de neurônios granulares. O posicionamento dos eletrodos de estímulo e de registro é representado esquematicamente na figura 1. A resposta antidrômica aparece quase simultaneamente com a estimulação. A latência da resposta é bem curta (0,4 ms a 1 ms), indicando uma ativação direta e rápida dos neurônios por mecanismos não sinápticos (estimulação axonal retrógrada).

Registros intracelulares em células granulares do giro denteado: para a obtenção dos registros intracelulares a micropipeta foi posicionada verticalmente à fátia (na camada granular do giro denteado) e aproximada lentamente com o auxílio de um micromanipulador de alta precisão (Huxley p-85, Sutter Instrument Co.). Pulsos retangulares longos de 200 ms de corrente (0,4 nA) foram aplicados a intervalos de 2 segundos através da micropipeta de registro. O sinal eletrofisiológico, assim como mudanças na resistência do tecido, foi continuamente monitorado por um osciloscópio HM-205-3 (HAMEG, 20 MHz). Este procedimento permite obter informações quanto a distância entre a ponta do eletrodo e a célula a ser registrada. Após penetração na célula o potencial sofre queda abrupta dos níveis do potencial de membrana da célula em questão. Os registros intracelulares nos diferentes protocolos de estimulação iniciaram-se 10 a 15 minutos após a penetração.

O circuito *brigde* no amplificador Axoclamp-B foi continuamente conferido e ajustado antes de cada medição do potencial elétrico.

RESULTADOS

Aspectos neuropatológicos do hipocampo humano na epilepsia do lobo temporal

A determinação da perda neuronal (porcentagem de diminuição da DCV), nos 6 casos investigados, evidenciou esclerose moderada em 3 (casos 2, 5 e 6) e intensa nos outros (casos 1, 3 e 4). A esclerose moderada (Figura 3A) foi caracterizada pela preservação de celularidade abundante de CA4, ausência de perda das células granulares do giro denteado e perda celular parcial nos setores CA3 e principalmente CA1. A esclerose intensa (Figura 3B), ao contrário, manifestou-se por perda importante, por vezes quase total, da celularidade de CA4, perda inconstante e moderada na população das células granulares associada a modificações morfológicas desta estrutura (dispersão, bilaminação) e a perda celular quase total em CA3 e CA1. O setor CA2 apareceu preservado ou apresentou apenas perda celular discreta em todos os casos.

Características eletrofisiológicas do giro denteado em pacientes com epilepsia do lobo temporal

Os registros no giro denteado da formação hipocampal dos seis pacientes mostraram diferentes tipos de respostas à estimulação antidrômica (hilar) ou ortodrômica (estimulação da via perfurante). A estimulação hilar pode ser útil na determinação do grau de circuitaria recorrente no giro denteado do hipocampo epilético, já que podem ser ativados circuitos polissinápticos¹⁸. Em decorrência deste fato, em nosso estudo consideramos esse tipo de configuração de registro como padrão. A resposta do giro denteado após estimulação hilar mostrou espículas com amplitude média de $5,3 \text{ mV} \pm 1,3 \text{ mV}$. Os registros extracelulares realizados nas diferentes fatias cerebrais mostraram presença de respostas evocadas de diferentes tipos. Algumas foram aparentemente normais, porém, em outras áreas do mesmo giro denteado, foram detectadas respostas com características epileptiformes (Figura 4). Esse resultado indica heterogeneidade na expressão das alterações epileptiformes no tecido estudado em condições de LCRa normal (3,5 mM $[\text{K}^+]$).

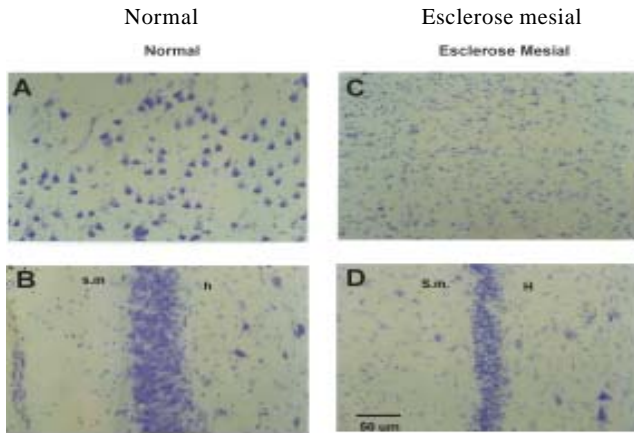


Figura 3

FIGURA 3

Diferentes graus de esclerose hipocampal. Na esclerose moderada do caso HPC02 observa-se população de neurônios piramidais em CA1 (A1) e interneurônios no hilo (CA4) do giro denteado (A2). Em contraste, o caso HPC04 apresenta intensa perda neuronal (despopulação de células piramidais) em CA1 (B1). Nota-se intensa celularidade (típico de processo de gliose). O giro denteado desse caso também mostrou sinais de esclerose caracterizados por diminuição da largura da camada de células granulares ($< 50 \mu\text{m}$) e perda de interneurônios no hilo (B2) (as setas mostram alguns interneurônios remanescentes).

Respostas evocadas no giro denteado de hipocampo humano epiléptico mostrando heterogeneidade na atividade epileptiforme

3,5 mM $[\text{K}^+]$

Respostas evocadas no giro denteado de hipocampo humano epiléptico mostrando heterogeneidade na atividade epileptiforme

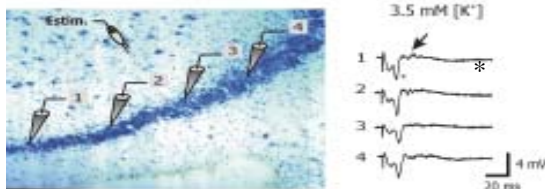


Figura 4 Em 3 resposta aparentemente normal. Em 1, 2 e 4 resposta epileptiforme. Observe pequenas espículas após o potencial evocado inicial (*).

FIGURA 4

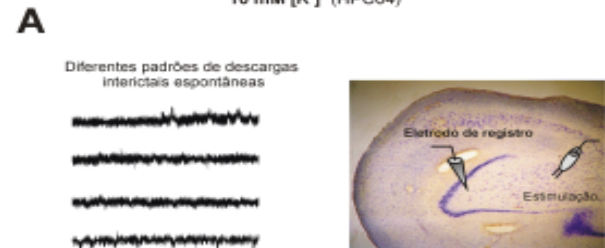
Em 3 resposta aparentemente normal. Em 1, 2 e 4 resposta epileptiforme. Observe pequenas espículas após o potencial evocado inicial (*).

Em concentração de 10 mM de potássio extracelular foram registrados diferentes tipos de descargas epileptiformes que não foram observadas nos experimentos com 3,5 mM de $[\text{K}^+]$ (Figura 5). Pudemos classificar essas descargas em dois subtipos. As primeiras foram descargas epileptiformes espontâneas de curta duração

(100 ms a 300 ms), frequência variável (0,01 Hz a 0,7 Hz) e baixa amplitude ($1,1 \text{ mV} \pm 0,31 \text{ mV}$) sendo classificadas como descargas interictais (Figura 5A). Essas descargas interictais espontâneas foram detectadas em quatro pacientes (HPC02, HPC03, HPC05 ou HPC06). As segundas foram verificadas em condições de concentração elevada de potássio. Nestas foram observadas descargas epileptiformes rítmicas de baixa amplitude ($1,1 \pm 0,31 \text{ mV}$) quase contínuas de maior frequência, (0,9-2 Hz) chegando à faixa de atividade delta em alguns casos (Figura 5B). Essas descargas espontâneas prolongadas tinham características de descargas ictais de baixa frequência e foram detectadas em dois pacientes (HPC02 e HPC04).

A Diferentes padrões de descargas interictais espontâneas

Atividade epileptiforme interictal e ictal "in vitro" em giro denteado de paciente com epilepsia do lobo temporal 10 mM $[\text{K}^+]$ (HPC04)



B Descargas epileptiformes espontâneas (crise eletrográfica in vitro) (frequência 2-3 Hz)

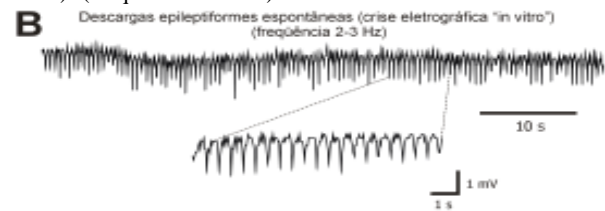


Figura 5

FIGURA 5

Atividade epileptiforme interictal e ictal *in vitro* em giro denteado de paciente com epilepsia do lobo temporal 10 mM $[\text{K}^+]$ (HPC04)

No caso HPC06, cujos estudos de ressonância magnética e EEG ictal são mostrados na figura 6, foi verificada atividade epileptiforme intensa, caracterizada por descargas epiléticas de baixa voltagem ($< 1,5 \text{ mV}$), quase contínuas, sob a forma de oscilações, ou em salvas, porém, de maior frequência (30 Hz a 300 Hz) (HPC06) (Figura 7). Essa atividade mais rápida pode ser expressão de oscilações e ritmo gama hipocampal, previamente descrito *in vivo* por estudos de registros profundos em pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) refratária¹⁹.

Epilepsia do lobo temporal (Caso HPC06)
 Ressonância Magnética – Atrofia Hipocampal

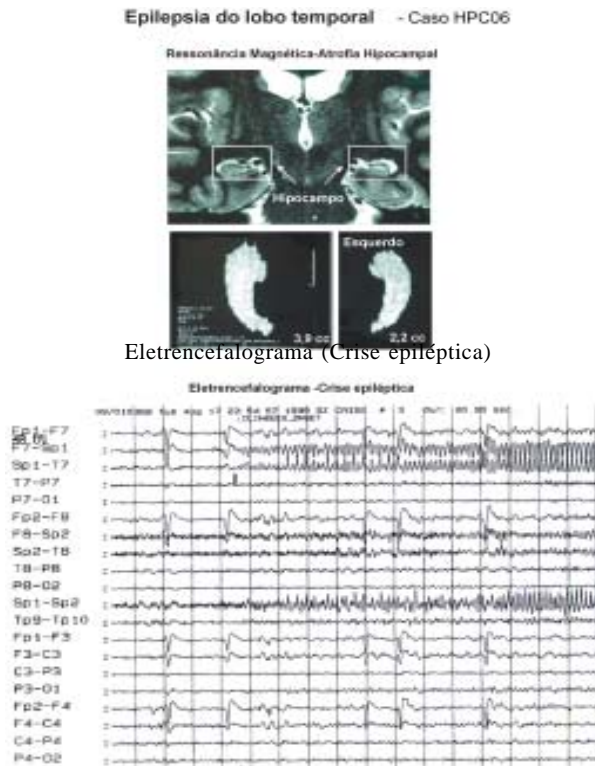


FIGURA 6

Paciente HPC06. Estudos de ressonância nuclear magnética. Hipersinal em T2 e diminuição volumétrica do hipocampo esquerdo. Atividade rítmica ictal na frequência teta no lobo temporal esquerdo, máxima no eletrodo esfenoidal esquerdo.

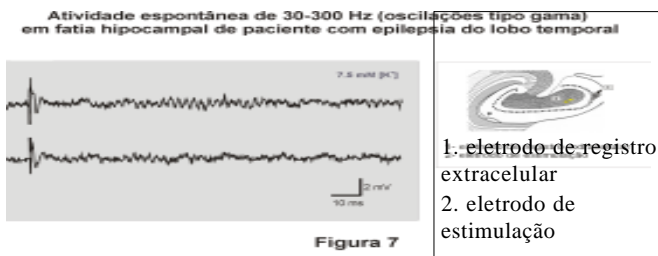


FIGURA 7

Atividade espontânea de 30 Hz a 300 Hz (oscilações tipo gama) em fatia hipocampal de paciente com epilepsia do lobo temporal

Refratariedade in vitro a drogas antiepilépticas

No caso HPC06 estudamos o efeito *in vivo* da aplicação de fenitoína (100 µM) e carbamazepina (100 µM) em fatias hipocampais tratadas com bicuculina que mostravam sinais evidentes de hiperexcitabilidade (após serem expostas a 2 µM de bicuculina) assumindo a forma de atividade epileptiforme de longa duração (potencial tipo DC shift). Nesse caso observou-se uma ligeira atenuação das descargas epileptiformes com ambas as DAE, porém não o desaparecimento completo das anormalidades epileptiformes. Este resultado é indicativo de um efeito antiepileptogênico parcial destas DAE e da persistência da refratariedade *in vivo* do tecido hipocampal obtido nas cirurgias de epilepsias (figura 8A e B).

Registros intracelulares de células granulares do giro denteado humano

Foram realizados registros intracelulares em seis células granulares do giro denteado observando-se que

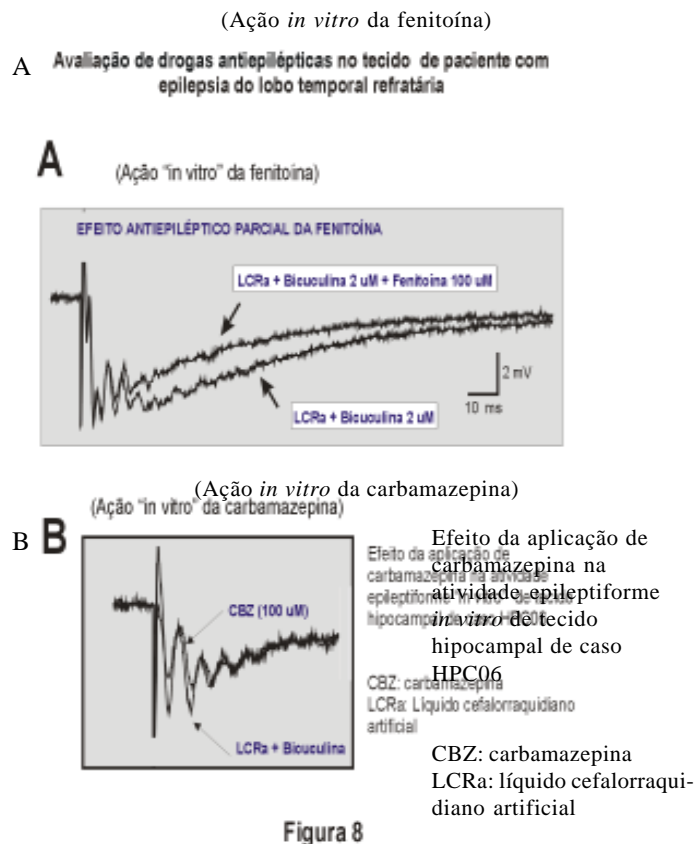


Figura 8

FIGURA 8

Avaliação de drogas antiepilépticas no tecido de paciente com epilepsia do lobo temporal refratária

três delas dispararam alguns potenciais de ação com acomodação (diminuição da frequência de disparo com o tempo de estimulação) (Figura 9A) enquanto outras mostraram descargas contínuas de potenciais de ação sem acomodação (Figura 9B), o que sugere heterogeneidade nos subtipos eletrofisiológicos dos neurônios desta região. O potencial de membrana dessas células foi de $62,5 \text{ mV} \pm 2,2 \text{ mV}$; a amplitude do potencial de ação de $88 \text{ mV} \pm 3,2 \text{ mV}$ e a duração deste de $2,1 \text{ ms} \pm 0,05 \text{ ms}$. O limiar de disparo foi de $-55,1 \text{ mV} \pm 1,2 \text{ mV}$.

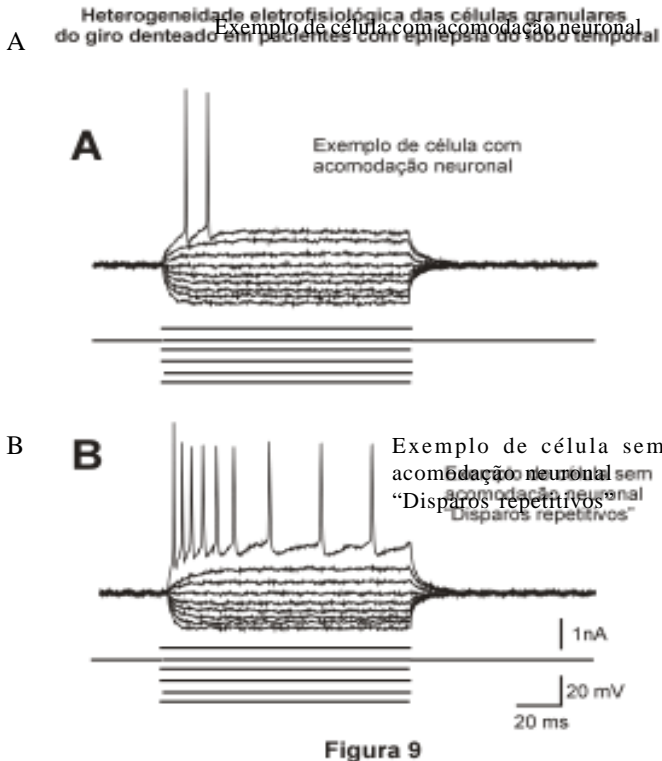


FIGURA 9

Heterogeneidade eletrofisiológica das células granulares do giro denteado em pacientes com epilepsia do lobo temporal

DISCUSSÃO

Os dados apresentados no presente trabalho indicam que o tecido hipocampal de pacientes com ELT expressa epileptogenicidade *in vitro* quando estudado eletrofisiologicamente em fatias cerebrais. As alterações epileptiformes estiveram presentes em todos os casos, independentemente do grau de esclerose hipocampal. Esse resultado confirma dados da literatura mostrando a persistência da hiperexcitabilidade *in vitro* do tecido epilético humano^{2,3,20,21}. Um achado interessante nesta

pesquisa foi a presença de heterogeneidade nas respostas evocadas indicando que o grau de anormalidades epileptogênicas expressa-se de forma diferencial com maior intensidade em algumas áreas ou locais do giro denteado. Porém, essa heterogeneidade nas anormalidades epileptiformes pode também estar presente em outras áreas hipocampais. Diversos estudos têm mostrado que a formação hipocampal participa ativamente na gênese das descargas interictais e ictais atuando como foco epileptogênico na ELT^{22,23}. A variabilidade local no grau de epileptogenicidade sugere que determinadas áreas são mais propensas para gerar ou talvez iniciar os fenômenos epiléticos no interior do foco epileptogênico primário.

As alterações observadas podem ser decorrentes de anormalidades focais na neurotransmissão glutamatérgica ou GABAérgica. De fato, na EMT a hiperexcitabilidade é atribuída ao aumento funcional de uma subpopulação de sinapses glutamatérgicas que usam receptores de NMDA²⁴⁻²⁶ decorrente de alteração na fosforilação do receptor de NMDA²⁷ ou de algumas de suas variedades. Tais mudanças na expressão de subunidades de receptor específico para glutamato foram observadas em pacientes com EMT²⁶ e em modelos experimentais de epilepsia²⁷. Estudos recentes na ELT humana²⁸ demonstram, ainda, alteração de receptores tipo AMPA e participação de circuitos polissinápticos da gênese da atividade epileptiforme.

Diversos estudos descreveram também alterações na neurotransmissão GABAérgica em tecido humano obtido de cirurgias para tratamento da ELT²⁹. No presente trabalho, observamos que a maioria das fatias cerebrais mostrou inibição por pulsos pareados e que a aplicação de bicuculina acentuou a atividade epileptiforme nas fatias cerebrais de três pacientes. Esses achados indicam a persistência de pelo menos algum grau de funcionalidade do sistema inibitório no giro denteado desses casos. A gênese de descargas epileptiformes interictais ou de crises epiléticas pode estar associada a falha transitória do sistema inibitório no cérebro desses pacientes como a observada após a aplicação da bicuculina.

Um outro mecanismo que poderia ser implicado na epileptogenicidade seria mediado pela hiperexcitabilidade do sistema glutamatérgico, a qual não seria compensada pelo grau de atividade inibitória GABAérgica local. De fato, trabalhos recentes mostraram que há variabilidade na expressão de proteínas do sistema GABAérgico especificamente da enzima descarboxilase do ácido glutâmico-65 kDA (GAD-65) e de transportadores de GABA (GAT1 e GAT3) no hipocampo de pacientes com ELT³⁰. Esses dados indicam que as alterações no sistema inibitório na ELT são complexas e

podem ter uma expressão heterogênea em cada caso em particular.

Algumas fatias estudadas na presente investigação apresentaram atividade espontânea em ampla banda de frequências. A atividade na faixa menor que 4 Hz pode estar associada à gênese dos ritmos intrínsecos hipocampais, como, por exemplo, da atividade teta hipocampal³¹. Um outro fenômeno observado nessas fatias foi a presença de ritmos mais rápidos caracterizando oscilações na faixa de atividade gama entre 30 Hz e 300 Hz. Estes podem ser associados às oscilações rápidas descritas recentemente em estudos *in vitro* (SEEG) no hipocampo humano em pacientes com ELT³² e em modelos experimentais desse tipo de epilepsia obtidos pela aplicação de ácido cáínico³³.

No presente trabalho, detectamos que a atividade epileptiforme evocada no giro denteado de um paciente epilético (caso HPC06) foi resistente ao tratamento *in vitro* com fenitoína e carbamazepina. Embora tenha sido possível observar certa atenuação da atividade epilética após a aplicação destes fármacos, eles não se mostraram efetivos em suprimir o estado de hiperexcitabilidade induzido pela aplicação de baixas doses de bicuculina, simulando desinibição parcial *in vitro*. Esses achados comprovam o diagnóstico da refratariedade a DAE observada antes do procedimento cirúrgico.

O tecido humano epilético mantido *in vitro* pode, portanto, ser utilizado como um modelo apropriado para o desenvolvimento de DAE. Esse tecido apresenta um perfil neuroanatômico definido pelas alterações decorrentes da epilepsia de longa duração assim como circuitos epiléticos característicos do ser humano e expressão aberrante de receptores e canais iônicos “epiléticos”. Assim, as fatias cerebrais mantidas *in vitro* apresentam um potencial significativo para a descoberta de novas alternativas farmacológicas para tratamento das epilepsias.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O tecido hipocampal obtido da cirurgia de pacientes com epilepsia por EMT refratária a DAE possui propriedades eletrofisiológicas que indicam a ocorrência de epileptogenicidade intrínseca. As redes neuronais exploradas no giro denteado mostram hiperexcitabilidade e potencialidade *in vitro* para o desenvolvimento de atividade interictal e ictal espontânea. A refratariedade a DAE pode ser também avaliada no tecido humano *in vitro*. Esse tipo de investigação em fatias cerebrais pode contribuir para o desenvolvimento de DAE mais racionais

para o tratamento da epilepsia. O tecido humano é uma fonte valiosa de informação sobre a fisiopatogênese dos distúrbios epiléticos e por meio da caracterização eletrofisiológica e molecular deste tecido podemos esclarecer questões referentes aos mecanismos básicos da epileptogênese e intratabilidade medicamentosa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

O presente trabalho foi desenvolvido com o apoio fundamental de entidades financiadoras de pesquisa como Fapesp, Capes, CNPq e Pronex. Agradecemos o apoio técnico oferecido pela estudante Patrícia R. Xavier (Fapesp) e os técnicos Mário Hikedá e Hilda Reis da Neurologia Experimental, EPM – Unifesp.

SUMMARY

Experimental Approaches to Study Human Hippocampus Obtained During Surgical Treatment of Patients with Drug-resistant Epilepsy

In the last decade, human epileptic tissue has been explored in the same experimental context as used for studies of animal models. These approaches has been applied *in vivo* in attempts made to examine the electrophysiological properties of epileptogenic areas to be removed in the surgery for intractable epilepsy. The epileptic tissue, specially the hippocampus in temporal lobe epilepsy, can also be analyzed in terms of *in vitro* electrophysiology or by different histopathological techniques. The development of such methodologies is useful to identify several epileptogenic determinants which are responsible for seizure generation in epileptic patients. In the present work, we present our preliminary findings in the combined research using human hippocampus resected from drug-resistant epileptic subjects. The correlation of experimental data with electroclinical information is crucial to understand the pathophysiology of epileptic disorders.

KEYWORDS

Epileptogenesis, hippocampus, electrophysiology, neuropathology.

Referências

1. Isokawa M, Avanzini G, Finch DM, Babb TL, Levesque MF. Physiologic properties of human dentate granule cells in slices prepared from epileptic patients. *Epilepsy Res*, 9:242-50, 1991a.
2. Isokawa M, Levesque MF. Increased NMDA responses, dendritic degeneration in human epileptic hippocampal neurons in slices. *Neurosci Lett*, 132:212-6, 1991.
3. Schwartzkroin PA. Hippocampal slices in experimental, human epilepsy. *Adv Neurol*, 44:991-1010, 1986.
4. McCormick DA. Refinements in the in-vitro slice technique, human neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 11:53-6, 1990.
5. Masukawa LM, Wang H, MJ, OC, Urano K. Prolonged field potentials evoked by 1 Hz stimulation in the dentate gyrus of temporal lobe epileptic human brain slices. *Brain Res*, 721:132-9, 1996.
6. Schmidt RP, Thomas LB, Ward Jr AA. The hyperexcitable neuron. Microelectrode studies of chronic epileptic foci in monkeys. *J Neurophysiol*, 22:285-96, 1959.
7. Wyler AR, Ojemann GA, Ward, Jr AA, Neurons in human epileptic cortex: correlation between unit, EEG activity. *Ann Neurol*, 11:301-8, 1982.

8. Dichter M, Spencer WA. Hippocampal penicillin "spike" discharge: epileptic neuron or epileptic aggregate? *Neurology*, 18:282-3, 1968.
9. Ward Jr AA. The epileptic neuron: chronic foci in animals, man. In: H. H. Jasper (ed.). *Basic mechanisms of the epilepsies*. Mass, Boston. 1969, pp: 263-88.
10. Babb TL, Brown WJ, Pretorius J, Davenport C, Lieb JP, Crandall PH. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 25:729-40, 1984.
11. Ayala GF, Dichter M, Gumnit RJ, Matsumoto H, Spencer WA. Genesis of epileptic interictal spikes. New knowledge of cortical feedback systems suggests a neurophysiological explanation of brief paroxysms. *Brain Res*, 52:1-17, 1973.
12. Johnston D, Brown TH. Control theory applied to neural networks illuminates synaptic basis of interictal epileptiform activity. *Adv Neurol*, 44:263-74, 1986.
13. Alarcon G, Seoane JJG, Binnie, CD, Miguel MCM, Juler J, Polkey CE, Elwes RDC, Blasco JMO. Origin, propagation of interictal discharges in the acute electrocorticogram – Implications for pathophysiology, surgical treatment of temporal lobe epilepsy. *Brain*, 12:2259-82, 1997.
14. Ajmone Marsan C. Electrographic aspects of epileptic neuronal aggregates. *Epilepsia*, 2:22-8, 1961.
15. Lieb JP, Babb TL, Engel JJ. Quantitative comparison of cell loss, thiopental-induced EEG changes in human epileptic hippocampus. *Epilepsia*, 30:147-56, 1989.
16. Engel Jr J. Intracerebral recordings: organization of the human epileptogenic region. *J Clin Neurophysiol*, 10:90-8, 1993.
17. Gabriel S, Eilers A, Kivi A, Kovacs R, Schulze K, Lehmann TN, Heinemann U. Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in area CA1 of hippocampal slices from normal, pilocarpine-treated epileptic rats. *Neuroscience Lett*, 242:9-12, 1998.
18. Masukawa LM, Urano K, Sperling M, O'Connor MJ, Burdette LJ. The functional relationship between antidromically evoked field responses of the dentate gyrus, mossy fiber reorganization in temporal lobe epileptic patients. *Brain Res*, 579:119-27, 1992.
19. Bragin A, Engel JJ, Wilson CL, Fried I, Mathern GW. Hippocampal, entorhinal cortex high-frequency oscillations (100-500 Hz in human epileptic brain, in kainic acid-treated rats with chronic seizures. *Epilepsia*, 40:127-37, 1999b.
20. Isokawa M, Levesque MF, Babb TL, Engel Jr J. Single mossy fiber axonal systems of human dentate granule cells studied in hippocampal slices from patients with temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, 13:1511-22, 1993.
21. Köhling R, Lücke A, Straub H, Speckmann E, Tuxhorn I, Wolf P, Pannek H, Ooppel F. Spontaneous sharp waves in human neocortical slices excised from epileptic patients. *Brain*, 121:1073-87, 1998.
22. Blume WT, Parrent AG, Kaibara M. Stereotactic amygdalohypocamptomy, mesial temporal spikes. *Epilepsia*, 38:930-6, 1997.
23. Kilpatrick C, Cook M, Kaye A, Murphy, Matkovic Z. Non-invasive investigations successfully select patients for temporal lobe surgery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 63:327-33, 1997.
24. Masukawa LM, Higashima M, Hart GJ, Spencer DD, O'Connor, MJ. NMDA receptor activation during epileptiform responses in the dentate gyrus of epileptic patients. *Brain Res*, 562:176-80, 1991.
25. Bernard C, Wheal HV. Plasticity of AMPA, NMDA receptor-mediated epileptiform activity in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 21:95-107, 1995.
26. Mathern GW. Increased hippocampal AMPA e NMDA receptor subunit immunoreactivity in temporal lobe epilepsy patients. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57:615-34, 1998.
27. Mathern GW, Bertram EH, Babb TL, Pretorius JK, Kuhlman PA, Spradlin S, Mendoza D. In contrast to kindled seizures, the frequency of spontaneous epilepsy in the limbic status model correlates with greater aberrant fascia dentata excitatory, inhibitory axon sprouting, increased staining for N-methyl-D-aspartate, AMPA, GABA(A) receptors. *Neuroscience*, 77:1003-19, 1997a.
28. Köhling R, Lucke A, Straub H, Speckmann EJ, Tuxhorn I, Wolf P, Pannek H, Ooppel F. Spontaneous sharp waves in human neocortical slices excised from epileptic patients. *Brain*, 121:1073-87, 1998.
29. Mathern GW, Pretorius JK, Kornblum HI, Mendoza D, Lozada A, Leite JP, Chimelli LM, Fried I, Sakamoto AC, Assirati JA, Levesque MF, Adelson PD, Peacock WJ. Human hippocampal AMPA, NMDA mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Brain* 120:1937-59, 1997b.
- Urano K, O'Connor MJ, Masukawa LM. Alterations of inhibitory synaptic responses in the dentate gyrus of temporal lobe epileptic patients. *Hippocampus*, 4:583-93, 1994.
30. Mathern GW, Mendoza D, Lozada A, Oretorius KK, Dehnes Y, Danbolt NC, Nelson N, Leite JP, Chimeli L, Born DA, Sakamoto A, Assirati JA, Fried I, Peacock WJ, Ojemann GA, Adelson PD. Hippocampal GABA, glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 52:453-72, 1999.
31. Burgess AP, Gruzelier JH. Short duration synchronization of human theta rhythm during recognition memory. *Neuroreport*, 8:1039-42, 1997.
32. Bragin A, Engel JJ, Wilson CL, Fried I, Buzsáki G. High-frequency oscillations in human brain. *Hippocampus*, 9:137-42, 1999a.
33. Bragin A, Engel JJ, Wilson CL, Fried I, Mathern GW. Hippocampal, entorhinal cortex high-frequency oscillations (100-500 Hz) in human epileptic brain, kainic acid treated rats with chronic seizures. *Epilepsia*, 40:127-38, 1999c.

Endereço para correspondência:

Esper A. Cavalheiro
 Departamento de Neurologia e Neurocirurgia
 Rua Botucatu 862
 CEP 04023-900 – São Paulo, SP.
 E-mail: esper.nexp@epm.br