

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE CÉLULAS DA GLIA DA SUBSTÂNCIA BRANCA E CORRELAÇÃO COM ACHADOS DE NEUROIMAGEM DE PACIENTES COM EPILEPSIA TRATADOS CIRURGICAMENTE EM UMA INSTITUIÇÃO BRASILEIRA

Ingrid Carolina da Silva Cardoso – graduanda
Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP

Bruna Cunha Zaidan, Brunno Machado de Campos, Luciana Ramalho Pimentel da Silva, Vanessa C. Mendes Coelho,
Marina Koutsodontis Machado Alvim, Clarissa Lin Yasuda, Enrico Ghizoni, Helder Tedeschi, Fernando Cendes, Fabio Rogerio

Introdução

- A epilepsia é uma doença neurológica comum [1]. Quase 30% dos pacientes são resistentes a medicação e se tornam candidatos à cirurgia, sendo a esclerose hipocampal (EH) e a displasia cortical focal (DFC) os achados neuropatológicos mais frequentes [2].
- Estudos anteriores relataram alterações histológicas e de neuroimagem na substância branca (SB) de pacientes, incluindo astrócitos e população microglial [3].

Objetivo

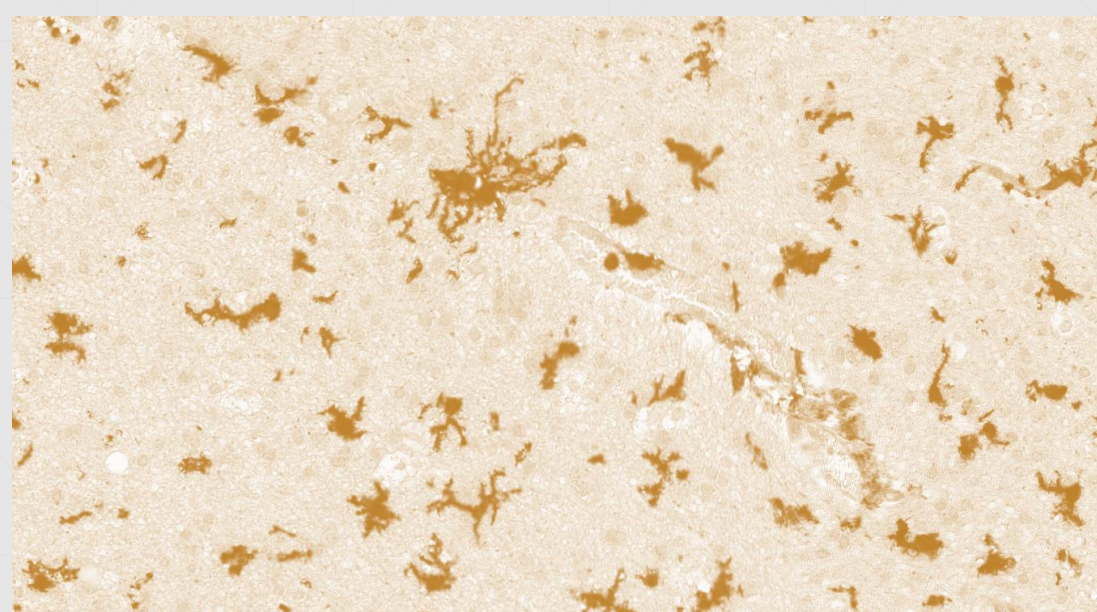
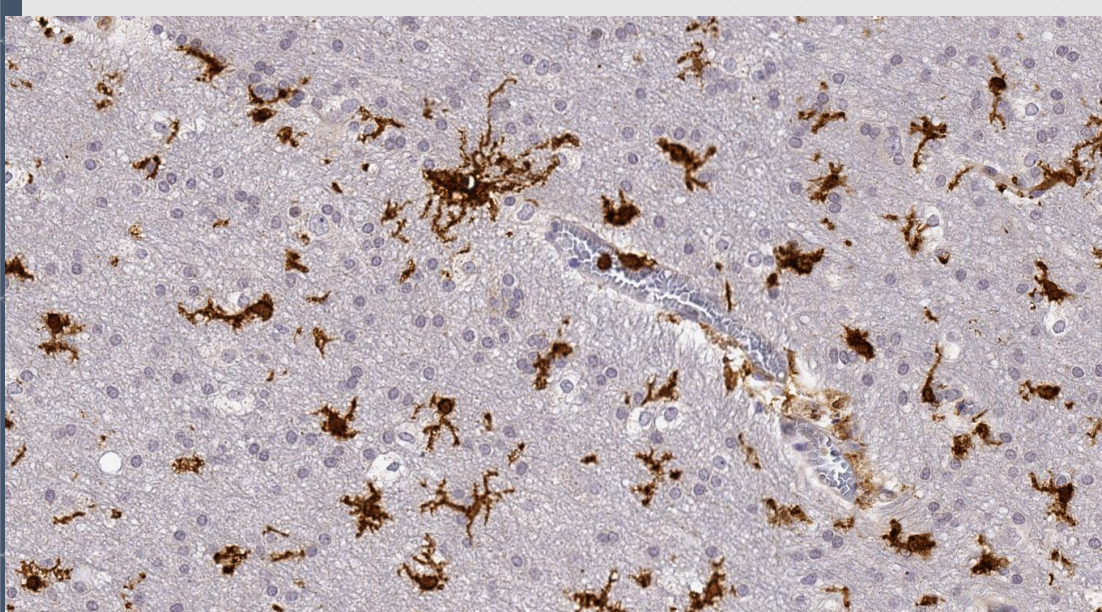
- Estudar alterações histopatológicas e radiológicas da substância branca de espécimes cerebrais de pacientes submetidos a cirurgia de epilepsia por hipótese diagnóstica clínico-radiológica de EH ou DCF.

Material e Métodos

- A análise de cortes histológicos de espécimes de paciente com epilepsia (n=21) e grupos controle (pacientes autopsiados sem história de doença neurológica; n=20) foi feita por meio de imunistoquímica para GFAP e Iba-1 para avaliar as populações astrocitária e microglial, respectivamente.

Material e Métodos

- Todos os cortes foram escaneados com o software Aperio Scanscope e as fotos digitalizadas da SB foram analisadas com o software ImageJ®.
- Aplicando a ferramenta “Thresholding”, cada imagem foi transformada em escala de cinza com um ponto de corte definido para converter a foto em informação binária (preto/branco).
- O software calculou o valor dos pixels pretos e o total de pixels do campo, fornecendo uma proporção definida como “Média”.



■ B: Peroxidase



■ C: Imagem após conversão binária (preto/branco)

■ A: Imunoistoquímica / HE

	Area	Mean	Min	Max	%Area
1	1005040	14.085	0	255	5.524

- Exemplo da ferramenta “Thresholding” e o valor “Média”.

Material e Métodos

- Examinamos ressonâncias magnéticas (RM) (3T Philips Achieva) dos lobos frontal, temporal e occipital de pacientes (n = 21) e um subgrupo de pacientes com EH (n = 9), comparando com controles pareados, seguindo um protocolo de rotina [4] .
- As imagens multieco ponderadas em T2 foram avaliadas com software próprio. Os sinais T2 foram computados a partir de cinco ecos em regiões de interesse (ROI) na SB.
- As imagens ponderadas em DWI e T1 foram avaliadas usando o software ExploreDTI [5]. De cada ROI, obtivemos os valores médios dos seguintes parâmetros: anisotropia fracionada (AF), difusão média, axial e radial.
- Para avaliação estatística, utilizou-se um nível de significância de $p < 0,05$.



Resultados

- Encontramos aumentos significativos nos valores de “média” de imunomarcações por Iba-1 e GFAP de amostras de pacientes com epilepsia em comparação com controles ($p < 0,001$), tanto na substância branca superficial (SBS) quanto na substância branca profunda (SBP).



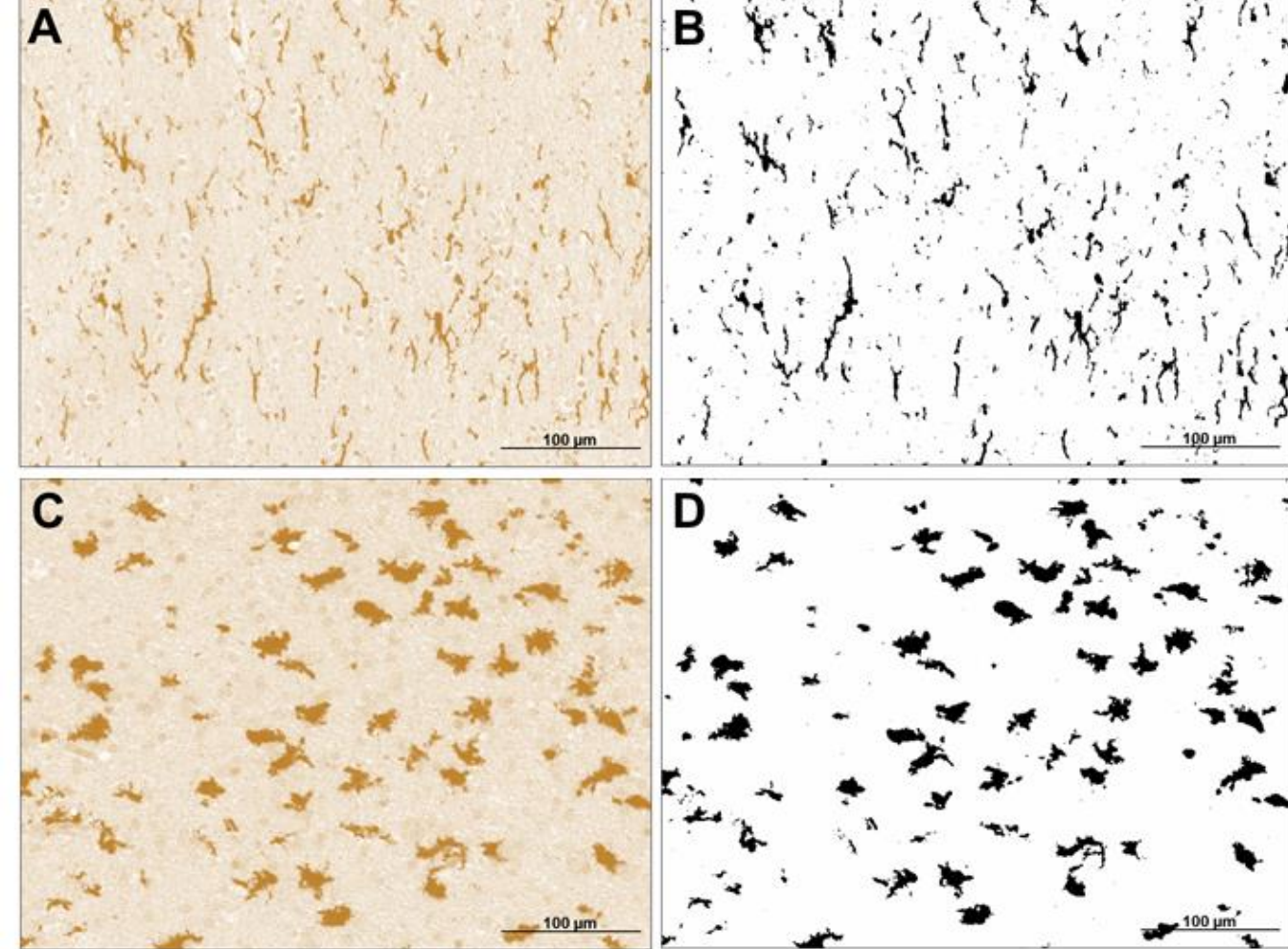


Figura 1: Análise quantitativa da população microglial por coloração para Iba-1.

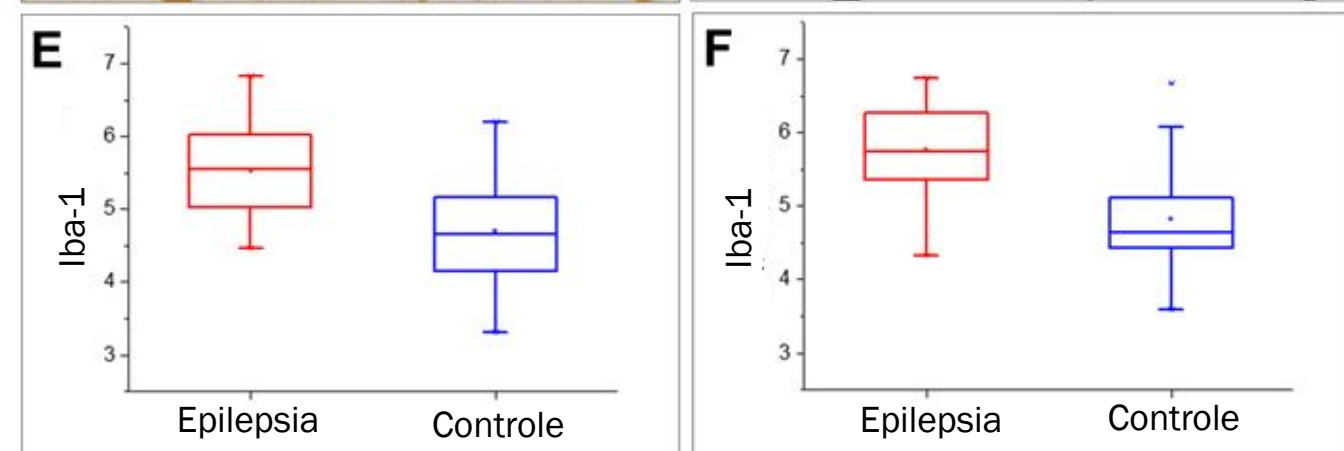
- A e C: Amostras sem contra coloração no controle e paciente, respectivamente.
- B e D: Transformação das imagens em A e C, respectivamente, para aumentar o contraste binário (limiar)
- E e F: Representações gráficas da porcentagem média de marcação para Iba-1 em SBS (E) e SBP (F).
- A e C: peroxidase. Barra de escala: 100µm (A – D).

Análise quantitativa da população microglial por coloração para Iba-1 ($p < 0,001$)

Grupo Epilepsia (E) versus Controle (C)

SBS (E: 5.53 ± 0.65 vs C: 4.7 ± 0.78)

SBP (E: 5.76 ± 0.62 vs C: 4.82 ± 0.71)



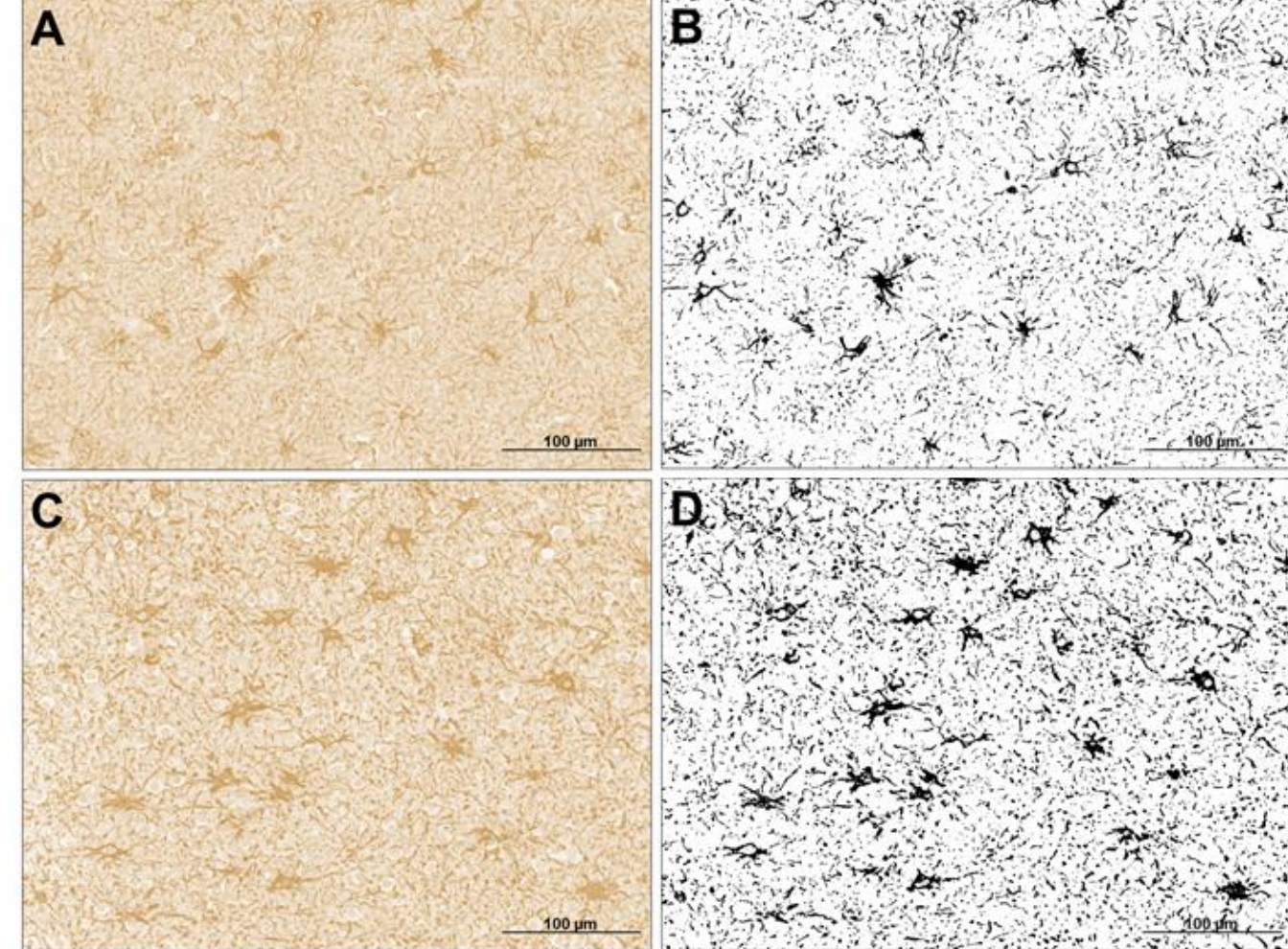


Figura 2: Análise quantitativa da população de astrócitos por coloração para GFAP.

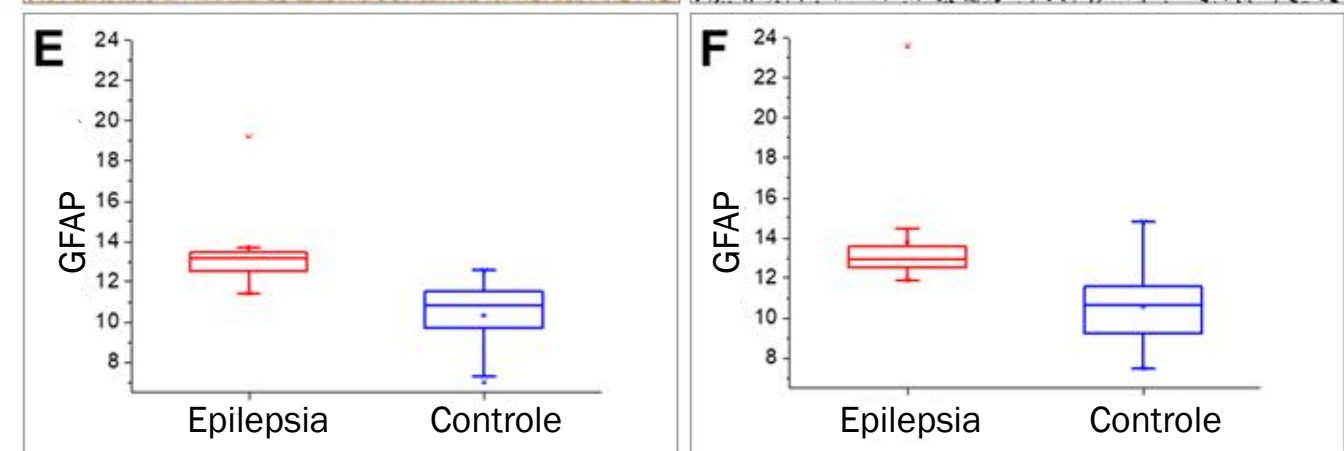
- A e C: Amostras sem contra coloração no controle e paciente, respectivamente.
- B e D: Transformação das imagens em A e C utilizando a ferramenta “thresholding”.
- E e F: Representações gráficas da porcentagem média de marcação para GFAP em SWM (E) e DWM (F).
- A e C: peroxidase. Barra de escala: 100µm (A – D).

Análise quantitativa da população de astrócitos por coloração para GFAP ($p < 0,001$)

Grupo Epilepsia (E) versus Controle (C)

SBS (E: 13.68 ± 2.1 vs C: 10.29 ± 1.71)

SBP (E: 13.75 ± 2.61 vs C: 10.56 ± 1.66)



Resultados

- Além disso, encontramos aumento significativo do sinal T2 dos pacientes em relação aos controles ($p < 0,001$), bem como ao comparar os pacientes com EH aos controles ($p = 0,003$).

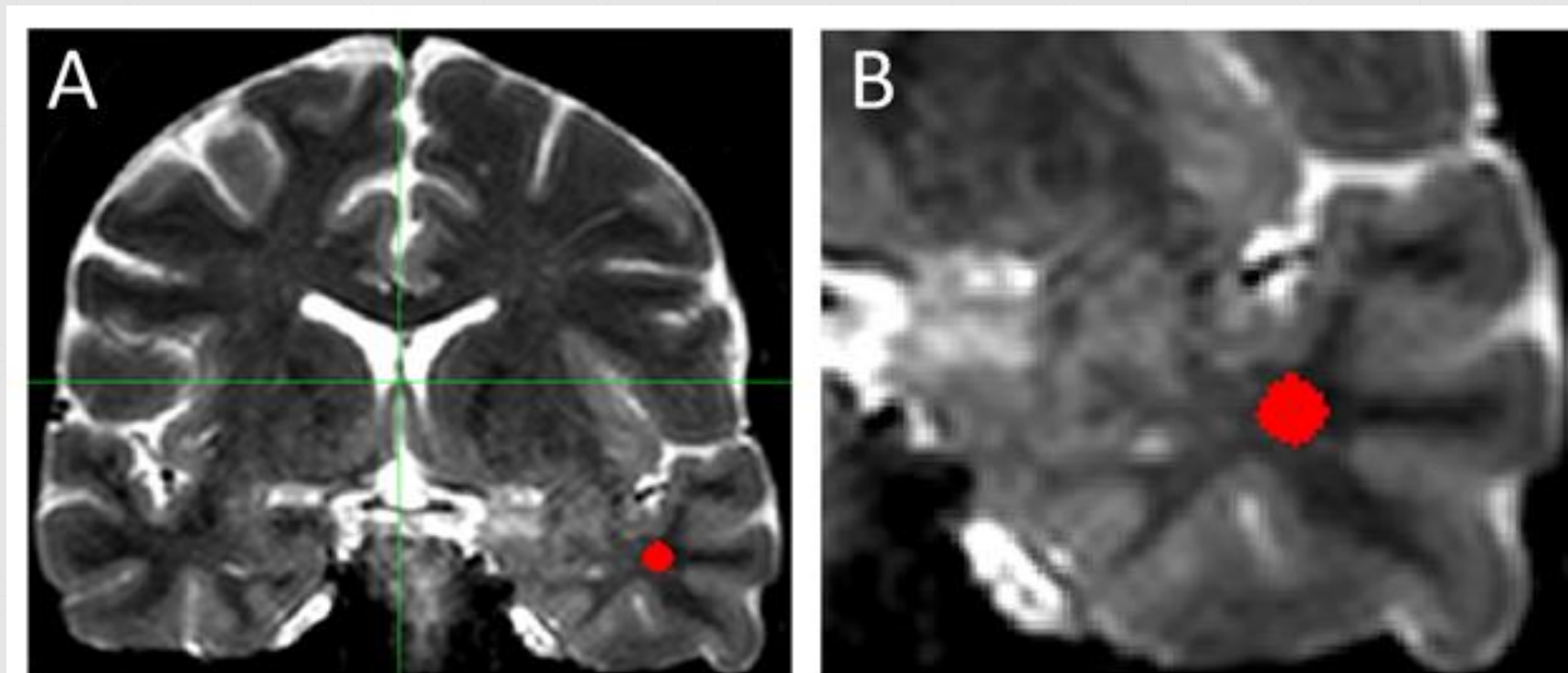
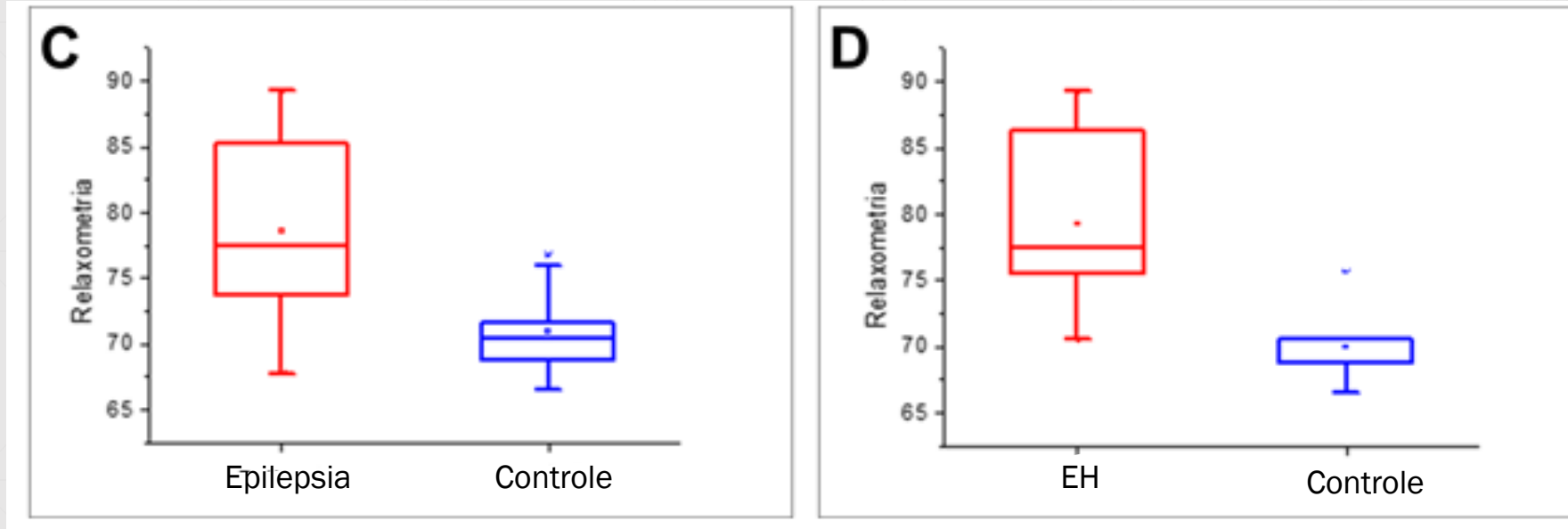


Figura 3: Imagens multieco coronais ponderadas em T2 mostrando a localização da ROI na substância branca do polo temporal (A: varredura completa, B: detalhe da varredura mostrada à esquerda).



Resultados



Grupo Epilepsia (E) versus Controle (C)

Grupo total ($p < 0,001$):

(E: $78,57 \pm 6,58$; C: $70,92 \pm 2,95$)

Grupo apenas de pacientes com HS ($p = 0,003$):

(E: $79,19 \pm 6,97$; C: $69,97 \pm 2,92$)



Resultados

- A análise das imagens DWI demonstrou diminuição significativa da AF principalmente no polo temporal dos pacientes com EH em relação aos controles ($p=0,042$) e na área contralateral ($p=0,028$).
- Não houve correlação significativa entre os parâmetros avaliados pela imunohistoquímica (Iba-1 e GFAP) e os parâmetros avaliados na imagem.



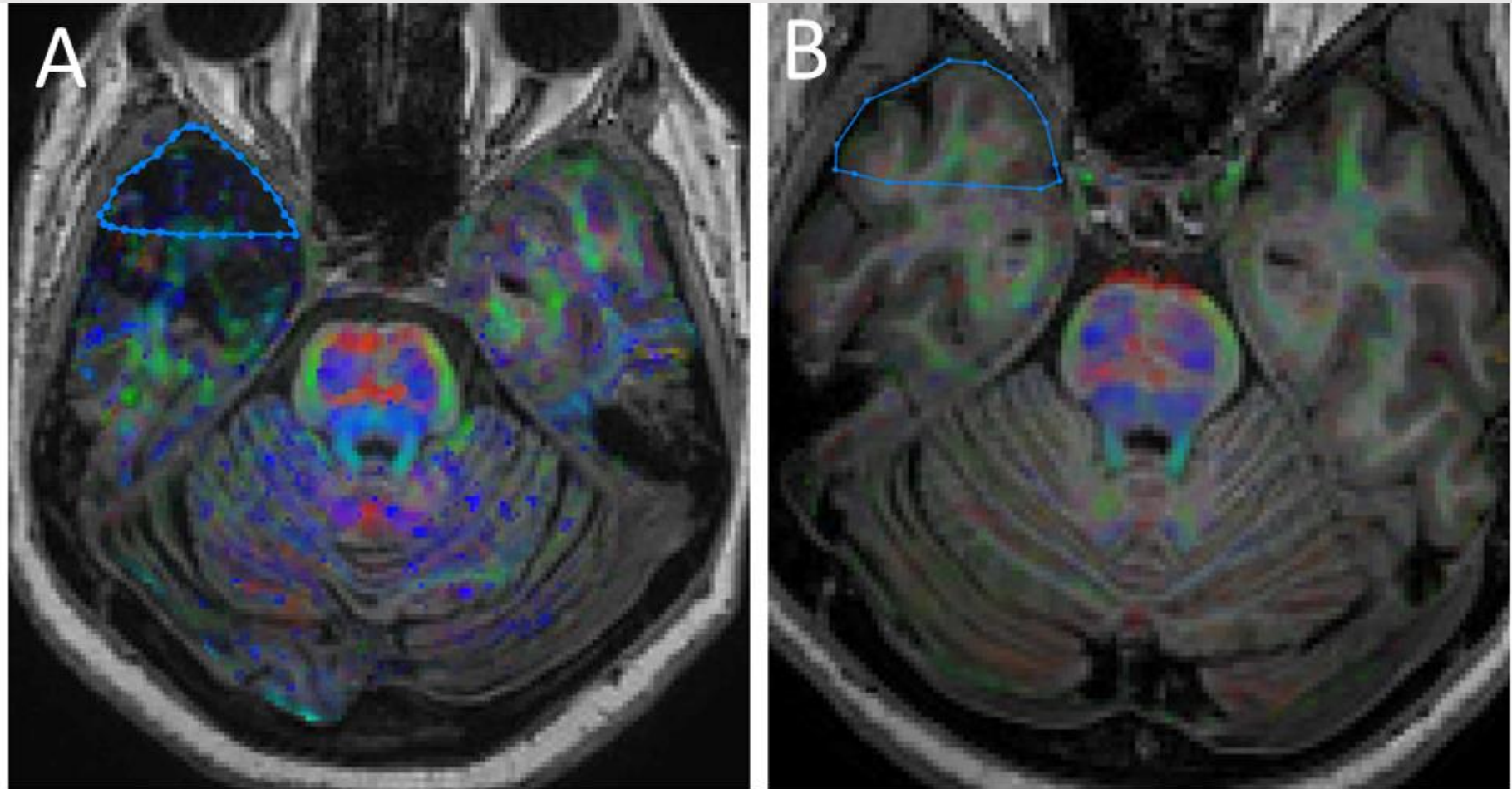


Figura 4: DWI co-registrado às imagens volumétricas ponderadas em T1 mostrando a localização da ROI na substância branca do lobo do polo temporal.

Esquerda: Epilepsia | Direita: Controle



Discussão e Conclusão

- A expressão aumentada de Iba-1 pode corresponder à ativação microglial, cujo papel biológico nas convulsões depende do estágio da doença: inibitório ou estimulatório para epilepsia aguda ou crônica, respectivamente [6 - 8].
- Da mesma forma, o aumento da expressão de GFAP (gliose) pode desempenhar um papel na inibição ou promoção de convulsões, bem como nas comunicações sinápticas [9]. Além disso, a interação microglia e astrócitos pode induzir a co-ativação crônica [10].



Discussão e Conclusão

- O hipersinal T2 está associado à maior quantidade de água livre nos tecidos, o que ocorre no caso da gliose [11,12].
- A diminuição da AF pode corresponder a uma diminuição da integridade axonal [13].
- Nossas observações são originais para indivíduos brasileiros com epilepsia e concordam com estudos anteriores de outras instituições.
- Financiamento: FAPESP (2013/07559-3, 2019/08259-0, 2020/12651-0) e FAEPEX Unicamp (2037/19).



Referências

- [1] Steinhauser C et al.; doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.12.047;
- [2] Blumcke I et al., doi: 10.1056/NEJMoa1703784;
- [3] Deleo F et al., doi: 10.1016/j.eplepsyres.2017.11.010
- [4] Kubota BY et al., doi: 10.1016/j.yebeh.2015.04.001;
- [5] Lebel C et al., doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.12.053
- [6] Eyo UB et al., doi: 10.1523/JNEUROSCI.0416-14.2014
- [7] Luo C et al., doi: 10.1002/glia.23018.
- [8] Vezzani A et al., doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-12-05054.1999.
- [9] Ortinski PI et al., doi: 10.1038/nn.2535.;
- [10] Kinoshita S et al., doi: 10.4103/1673-5374.300976
- [11] Jackson GD et al., doi: 10.1212/wnl.43.9.1793.
- [12] Briellmann RS et al., doi: 10.1212/wnl.58.2.265.
- [13] Concha L et al., doi: 10.1523/JNEUROSCI.1619-09.2010.



OBRIGADA!

