

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica**

**ASPECTOS RELACIONADOS AO MECANISMO DE EPILEPSIA NO  
HIPOCAMPO E NO CÓRTEX DISPLÁSICO**

**Autora: Arlete Hilbig**

**Orientadora: Lígia Maria Barbosa Coutinho**

**Co-Orientador: Thomas Babb**

**TESE DE DOUTORADO**

**2000**

Hilbig, Arlete

Aspectos Relacionados ao Mecanismo de Epilepsia no Hipocampo e Córtex Displásico/ Arlete Hilbig, — Porto Alegre, RS, 2000, 113p —.

1. Displasia Cortical na Infância
2. Correlação entre a Extensão da Displasia Neocortical Temporal e Densidade Neuronal no Hipocampo.
3. Anatomia Química do Hipocampo em Pacientes Pediátricos e Adolescentes com Epilepsia Hipocampal ou Extra-Hipocampal

## Índice

Introdução	04
Revisão da Literatura	05
Displasias Corticais	05
Associação entre Esclerose Hipocampal e Displasia Cortical	10
Objetivos	13
Bibliografia	14
Focal Cortical Dysplasia in Children	19
Displasia Cortical em Crianças	29
Correlation Between Extent of Temporal Neocortical Dysplasia and Hippocampal Neuron Densities	48
Correlação entre a Extensão da Displasia Neocortical Temporal e Densidade Neuronal no Hipocampo	72
Hippocampal Chemical Anatomy in Pediatric and Adolescent Patients with Hippocampal or Extrahippocampal Epilepsy	87
Anatomia Química do Hipocampo em Pacientes Pediátricos e Adolescentes Com Epilepsia Hipocampal ou Extra-Hipocampal	99

## Agradecimentos

Uma pesquisa nunca é um trabalho individual, mas de um grupo. Gostaria de agradecer a todos que, de diferentes maneiras, auxiliaram na realização desse trabalho.

Aos pacientes que permitiram o uso do material cirúrgico para pesquisa, sem os quais nada teria sido possível.

Aos colegas que me auxiliaram durante o período que estive em Cleveland e onde realizei grande parte dos meus trabalhos. Às técnicas Christi Wylie e Karina Yacubokva pelo auxílio técnico e a hospitalidade. À Zhong Ying e Nobuhiro Mikuni pelo auxílio nas tarefas mais difíceis e pelas discussões acadêmicas. À Imad Najm pelas excelentes discussões clínicas e orientações. À Thomas Babb que, além de orientador, mostrou-se um grande amigo desde o início do meu trabalho, pela segurança, simplicidade, dedicação e carinho com que conduziu toda a pesquisa. Ao grupo de Neurologia da The Cleveland Clinic Foundation, especialmente ao Dr. Hans Lüders, pela oportunidade que me proporcionaram de participação em todas as atividades científicas.

Ao grupo do Programa de Cirurgia de Epilepsia da PUCRS, especialmente ao Dr. Jaderson Costa da Costa, pelo apoio e pelos contatos para que se tornasse possível minha pesquisa no exterior.

Ao CNPq pelo importante apoio financeiro.

À Dra. Lígia Coutinho que sempre confiou no meu trabalho e me apoiou em todos os momentos, mesmos os mais difíceis. Pela sua compreensão, amizade, dedicação, e pelos seus exemplos, que valem muito mais que palavras.

À Almiro, Augusto e Juliana que compartilharam comigo cada minuto dessa caminhada e que sempre impulsionaram meu trabalho.



## INTRODUÇÃO

A idéia de que a epilepsia pudesse estar relacionada com neurônios “anormais” e dendritos “comprometidos” por lesões cerebrais, tumores ou infecções não é nova.

No final do século XVIII, Hughlings Jackson (1) descreveu um padrão complexo de crises epiléticas que eram acompanhadas por aura consistindo de sensações (odores e gostos peculiares) e sentimentos de irrealidade ou familiaridade como se fosse um sonho, o que ele chamou de “intellectual aura” ou “dreamy state”. Descrições de necrópsia relacionaram esse tipo de crise a lesões próximas ao hipocampo, mas centradas na região do uncus e do núcleo amigdalóide, um tumor temporo-esfenoidal (2) e a um amolecimento do giro uncinado (3). Assim, uma forma focal de epilepsia sintomática tornou-se estabelecida e foi associada a região temporo-esfenoidal, assim como as crises motoras da epilepsia jacksoniana tinham sido associadas ao córtex frontal. Outros autores (4, 5, 6), em estudos pós-morte, descreveram a associação da epilepsia temporal com lesão hipocampal característica que foi denominada de esclerose hipocampal.

A tentativa de tratamento cirúrgico das epilepsias também não é recente (7), mas inicialmente o diagnóstico histopatológico era muito difícil, pois o tecido era retirado em fragmentos. Em 1953, Falconer (8) desenvolveu a técnica da retirada “em bloco”, permitindo uma boa orientação anatômica e um exame histológico adequado. Desde então, houve grande progresso no entendimento das patologias associadas a epilepsia, principalmente do lobo temporal (TLE). Estudos cuidadosos de lobos temporais ressecados demonstraram que não apenas o hipocampo origina crises de lobo temporal “típicas”. Lesões do córtex temporal podem originar crises com semiologia idêntica. Atualmente se reconhece que em torno de 65 a 70% das TLE, existe esclerose hipocampal como única patologia. Nos restante 30 a 35%, estão presentes lesões, tanto congênicas como adquiridas, no neocórtex temporal (9, 10, 11).

A primeira descrição de displasia cortical focal em pacientes submetidos a cirurgia para tratamento da epilepsia foi feita por Taylor e colaboradores em 1971(12).

Esse autor relatou um conjunto de alterações histopatológicas observadas em 10 pacientes. A principal característica descrita foi a presença de uma desorganização localizada da laminação cortical com neurônios grandes e aberrantes espalhados por todas as camadas, com exceção da primeira. Essas áreas eram usualmente menores de 2 cm e freqüentemente células grandes e bizarras estavam presentes na substância branca subjacente. A sua série compreendia 5 pacientes com ressecções temporais, 4 extratemporal e 1 com ambos, frontal e temporal. As alterações foram observadas apenas ao estudo microscópico, sem modificações à macroscopia. Desde essa primeira descrição, um grande número de publicações tem estudado essa patologia que atualmente é uma das mais freqüentes em cirurgia da epilepsia. Em séries cirúrgicas, em torno de 60% dos diagnósticos são de EH enquanto 10-15% são de DC (9, 13, 14). Entretanto, se avaliarmos somente crianças e adolescentes, a freqüência de displasia aumenta para 26% do total e 46% das ressecções extra-temporais (15).

## **REVISÃO DA LITERATURA**

### Displasias Corticais

As displasias corticais (DC) são transtornos do desenvolvimento cortical. A principal característica das DC é a presença de uma arquitetura cortical anormal que resulta de alterações que podem ocorrer durante as diferentes fases do desenvolvimento cortical: proliferação, migração, diferenciação, morte celular programada de precursores neuronais e de neurônios, eliminação de sinapses, arborização dendrítica e remodelagem sináptica. Essas malformações podem ocorrer como consequência de múltiplos fatores etiológicos, genéticos e provavelmente também ambientais (13, 16, 17).

As anormalidades na arquitetura e nas propriedades neurofisiológicas do córtex manifestam-se, clinicamente, por epilepsia, atraso de desenvolvimento e alterações neurológicas focais. A epilepsia associada a DC é, em geral, de difícil tratamento com as medicações atualmente disponíveis e tende a afetar pacientes mais jovens e ser



mais freqüentemente extra-temporal, se comparada a outras causas de epilepsia (16, 18, 19). O reconhecimento dessas malformações *in vivo* através do aperfeiçoamento de técnicas de neuroimagem e a freqüente intratabilidade clínica, levando o paciente ao tratamento cirúrgico para controle das crises, têm permitido o estudo histopatológico do tecido cerebral displásico.

Sob o título de DC está incluído um espectro de alterações morfológicas distintas, o que têm gerado alguma confusão na literatura. Desde a primeira descrição da associação de epilepsia com DC (12), várias classificações têm sido propostas, baseadas primariamente nos aspectos morfológicos e em possíveis fatores causais (17, 18, 19). Alguns autores propõem classificações baseadas no “momento” provável do insulto (17, 20). Essas malformações eram inicialmente classificadas como distúrbios da migração neuronal. Atualmente, podemos dividi-las em pelo menos três grupos (21): (1) malformações corticais devido a proliferação neuronal e glial anormais; (2) malformações corticais devido a migração neuronal anormal; (3) malformações devido a organização cortical anormal.

As anormalidades da proliferação e diferenciação são as formas mais severas de DC e ocorrem em uma fase precoce do desenvolvimento. São também as que geralmente se associam às formas de epilepsia mais refratárias. Morfologicamente, podemos encontrar um espectro que compreende uma arquitetura cortical anormal, presença de neurônios displásicos e de células balonadas. A extensão da lesão varia desde uma área de displasia (displasia cortical focal) até o acometimento de todo um hemisfério, causando aumento de volume do lado acometido, geralmente associado a alterações de giros (hemimegalencefalia).

As anormalidades da migração neuronal incluem a heterotopia nodular periventricular e subcortical e defeitos de migração difusos de vários graus. Essas malformações não apresentam células displásicas ou balonadas, mas células imaturas aprisionadas em posições heterotópicas em bandas, nódulos ou camada subcortical.

As anormalidades da organização cortical ocorrem após a migração neuronal estar completa ou quase completa, ou seja, são anormalidades provavelmente mais tardias (17, 18, 20). A microdisgenesia, juntamente com a polimicrogiria e talvez a esquizencefalia, estariam incluídas nesse grupo. A microdisgenesia é caracterizada pela presença de alterações morfológicas leves e de significado patológico ainda controverso, mas que com frequência são encontrados em tecido cerebral de pacientes com epilepsia estando também presentes em casos de displasias corticais mais severas (17, 22). As alterações histopatológicas usualmente descritas são: desorganização da laminação cortical, presença de aglomerados neuronais ao longo das camadas corticais, aumento do número de neurônios na camada molecular e presença de neurônios na substância branca. Dessa forma, essas alterações poderiam ser consideradas como um espectro dentro das DC cujo insulto ocorre em fases mais tardias do desenvolvimento.

As formas de DC que têm sido mais extensamente estudadas são as anormalidades da migração e proliferação. As áreas de DC focal são caracterizadas por uma desorganização da estrutura cortical laminar e horizontal com presença de neurônios aberrantes com uma arborização dendrítica proeminente, geralmente com processos curtos e espessos, e às vezes com vacuolização citoplasmática. Esses neurônios estão presentes em todas as camadas corticais mas especialmente em camadas mais profundas, dando a impressão de um córtex espesso. Outra característica peculiar é a presença de células grandes, com citoplasma pálido e membrana celular mal definida e com núcleo deslocado para periferia, podendo às vezes apresentar dois ou até três núcleos. Essas células, denominadas células balonadas, formam um grupo de células sem uma caracterização definida, representando, mais provavelmente, células imaturas que pararam em algum ponto do desenvolvimento antes de completar seu processo de diferenciação. Os casos de epilepsia que se acompanham dessas células balonadas são geralmente os mais



refratários, demonstrando que elas provavelmente têm um papel importante como geradoras de crises.

As alterações anatômicas que ocorrem nas DC têm sido objeto várias publicações (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19). Entretanto, poucas enfocam questões importantes em relação ao mecanismo de epilepsia: (1) quais dessas modificações estão associadas a hiperexcitabilidade cortical e (2) porque a epilepsia associada a essas malformações é com tanta frequência refratária ao tratamento medicamentoso disponível. Uma possível explicação está em uma variação nas propriedades fisiológicas intrínsecas das células displásicas, o que está diretamente relacionado às características da membrana celular e seus canais iônicos (23, 24). Uma modificação na composição dos canais pode levar a uma hiperexcitabilidade pelo aumento das respostas aos neurotransmissores excitatórios. A formação de circuitos neuronais excitatórios aberrantes, a exemplo do que ocorre no hipocampo, e uma diminuição dos circuitos inibitórios são outras possibilidades que começam a ser investigadas.

O desenvolvimento de técnicas histopatológicas que permitem uma correlação morfológica e funcional tem auxiliado no melhor entendimento dessas questões. O estudo de proteínas que entram na composição de receptores de membrana ou em vias de metabolismo de neurotransmissores nos permite inferir a presença e localização de neurônios excitatórios e inibitórios, o que abre caminho para estudos funcionais e farmacológicos que vão auxiliar no desenvolvimento de novas drogas mais efetivas.

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro e possui dois grupos principais de receptores ionotrópicos, identificados a partir de estudos fisiológicos e farmacológicos com substâncias agonistas e antagonistas: (1) receptores AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido propiônico isoxasole), que são responsáveis pela despolarização rápida através da abertura de canais de sódio e potássio; e (2) receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), que medeiam despolarização neuronal prolongada através do influxo de cálcio e sódio (23, 25). As funções dos receptores

NMDA tem sido consideradas necessárias para o desenvolvimento de crises. Até o momento, duas subfamílias de receptores NMDA foram identificadas: NMDAR1 (NR1) e NMDAR2 (NR2). NR2 apresenta quatro subunidades (A-D) codificada por diferentes genes enquanto NR1 tem oito variantes por cisalhamento (A-H). Estudos *in vitro* em oócitos de sapo demonstraram que receptores compostos por qualquer combinação de moléculas NMDAR1 são funcionais mas a corrente de glutamato através desses canais é pequena. A presença isolada de NMDAR2 não forma canais iônicos funcionais. Entretanto, quando NR2 está combinado com NR1, existe a formação de canais funcionais e com condutância muito maior (20 a 60 vezes) em resposta tanto ao glutamato como ao NMDA (23, 25). Embora bastante estudado em animais, poucos estudos foram conduzidos em tecido humano utilizando anticorpos para esses receptores (26, 27, 28)

As modificações nos receptores pós-sinápticos têm um papel fundamental na epilepsia hipocampal (29, 30). Estudos imuno-histoquímicos demonstram aumento na densidade de proteínas de receptores AMPA e NMDA na camada molecular da fásia denteada na epilepsia hipocampal humana (29, 30). Esses estudos sugerem que uma alteração de receptores excitatórios levam a uma excessiva ativação da transmissão de glutamato e podem contribuir para as crises hipocampais. Além disso, existem evidências que antagonistas seletivos de receptores NMDA são potentes anticonvulsivantes em modelos animais de epilepsia (31).

Estudos utilizando eletrocorticografia demonstraram que as áreas de DC apresentam descargas epileptogênicas (32, 33). Entretanto, existem poucos estudos até o momento que enfoquem especificamente os mecanismos geradores de hiperexcitabilidade em DC, analisando circuitos excitatórios e inibitórios.

Spreafico et al. (27) estudaram, com técnica imuno-histoquímica, 3 pacientes com displasia cortical focal utilizando anticorpos contra receptores AMPA GluR2/3, NMDAR1 e proteínas ligadoras de cálcio, que são positivas em interneurônios inibitórios. Esses autores sugerem que a epileptogenicidade desse tipo de DC é



devido a um aumento dos neurônios excitatórios somado a uma diminuição dos interneurônios inibitórios. Esse estudo foi realizado em pacientes adultos, com epilepsias de longa duração, o que pode ser um modificador do padrão de receptores.

Ying et al. (26) estudaram 17 pacientes com DC utilizando imuno-histoquímica para subunidades de receptores de glutamato AMPA (GluR2/3) e NMDA (NR1 e NR2A/B). Esses autores demonstraram que neurônios displásicos, nas áreas de DC, eram positivos para NR2A/B, mostrando coloração tanto no corpo celular como nos dendritos e que a presença desses neurônios estava relacionada ao local de início das crises no EEG. Os neurônios corticais normais não mostraram positividade para NR2A/B, implicando que esses receptores de glutamato não estão presentes ou estão em quantidades muito pequenas no neocórtex temporal humano normal. Além disso, a intensidade de coloração dos neurônios displásicos tanto para NR1 como com GluR2/3 foi sempre maior que em neurônios normais, sugerindo um aumento na concentração de receptores de glutamato nessas células. Esses autores sugerem que a hiperexcitabilidade nas regiões de displasia cortical é devida, pelo menos em parte, a presença da subunidade NR2 que deveria estar ligada a NR1 no complexo receptor, aumentando a condutibilidade através desse canal iônico. A presença de NR2A/B poderia ser um "marcador funcional" nessas lesões. Outro fato interessante desse estudo é que 53% das displasias corticais do lobo temporal apresentavam também graus variáveis de esclerose hipocampal, ou seja, "dual pathology". Posteriormente, a utilização de imunofluorescência com dupla coloração NR1-NR2A/B visualizado em microscópio confocal (34) e a co-imunoprecipitação NR1-NR2A/B (36) confirmaram a expressão de ambas as subunidades apenas em neurônios displásicos, enquanto neurônios normais expressavam somente NR1 e não NR2A/B.

#### Associação entre Esclerose Hipocampal e Displasia Cortical

Esclerose Hipocampal (EH) e sua reorganização sináptica axo-dendrítica são condições bem estudadas e associadas com epilepsia hipocampal focal. Na esclerose hipocampal a distribuição da perda neuronal, gliose e neo-sinaptogênese no

hipocampo é relativamente estereotipada com a maior perda celular ocorrendo nas áreas CA1, CA4, e CA3 do corno de Ammon, e fásia denteada, enquanto a região de CA2 fica relativamente preservada. Não existe perda celular significativa no complexo subicular. Podem existir graus variáveis de EH que são definidos a partir de métodos quantitativos de contagem celular já bem estabelecidos (36). Além da perda neuronal, outra característica importante da EH é um brotamento axonal aberrante de fibras musgosas e axônios de neurônios GABAérgicos na camada molecular da fásia denteada. O mecanismo que promove o brotamento axonal seria a presença de sinapses livres na camada molecular após morte de neurônios no hilo e em CA4. Em modelos de epilepsia hipocampal e em EH humana, estudos recentes têm encontrado, além da perda neuronal e brotamento axonal, modificações em receptores excitatórios pós-sinápticos (AMPA e NMDA) na camada molecular da fásia denteada (37, 38, 39). Um aumento na positividade para NMDAR2 está correlacionado com maior brotamento axonal na camada molecular interna (37). Aparentemente, com a perda neuronal e o brotamento axonal, a região que recebe colaterais axonais aberrantes responde modificando, pelo menos, seus receptores pós-sinápticos excitatórios. Portanto, o brotamento axonal pode formar conexões axonais anormais, mas funcionais, levando a hiperexcitabilidade em uma região pobre em neurônios.

A EH é o achado histopatológico mais freqüente em epilepsia temporal submetida a tratamento cirúrgico e é relatada como uma anormalidade isolada em aproximadamente 60-70% dos casos. No restante dos pacientes, diferentes tipos de patologia neocortical são diagnosticados. Entretanto, alguns desses pacientes têm lesões tanto no hipocampo como no neocórtex temporal, o que chamamos de “dual pathology”, cuja incidência varia de 11% (40) a 20% (41). Esse termo, em geral, refere-se a associação de tumores com EH. A freqüência da associação entre DC e EH não foi ainda bem estabelecida.

Do ponto de vista clínico e eletroencefalográfico, apesar de existirem condições que favoreçam a suspeita do diagnóstico de uma lesão neocortical em epilepsia



temporal, a distinção entre crises de origem hipocampal ou neocortical temporal é, em grande parte dos pacientes, bastante difícil (42). A melhora das técnicas de neuroimagem, especialmente a RM, veio a auxiliar no diagnóstico *in vivo* de lesões neocorticais. Entretanto, a presença de displasia cortical nem sempre é evidente à RM e o diagnóstico definitivo só é feito na histopatologia (43).

A causa de EH é desconhecida e pode ser multifatorial. A associação entre DC e EH tem um significado etiológico potencial e é também clinicamente importante pois pode influenciar na escolha terapêutica e no prognóstico pós-operatório. Alguns estudos, baseados em RM com volumetria, relatam essa associação. Cendes et al. (44) encontraram atrofia hipocampal em 15% dos pacientes com outras lesões temporais ou extra-temporais. A associação entre DC e atrofia hipocampal nesse estudo foi maior do que com outras lesões (25%). Os autores sugerem que um mecanismo patogênico comum durante o desenvolvimento pré ou peri natal poderia explicar a ocorrência concomitante de esclerose hipocampal e DC. Raymond et al. (46), estudando um grupo de 100 pacientes, encontraram CD associada a EH em 15. Ho et al. (43) selecionaram um grupo de 30 pacientes com DC em lobo temporal e encontraram uma incidência de atrofia hipocampal em 87% dos casos, sendo 57% desses, bilateral. Estudos clínicos também sugerem que uma malformação pode preceder o desenvolvimento de EH (46). Entretanto, faltam estudos histopatológicos que avaliem essa questão.

Outro assunto ainda não bem avaliada em relação a EH é se ela é progressiva ou não ao longo dos anos e se existem diferenças entre os achados em hipocampus de crianças e adultos. Em modelos animais de epilepsia, o brotamento de fibras musgosas na camada molecular interna aumenta com o aumento da sobrevida, apesar da evidência de que pouca perda neuronal adicional pode ser encontrada (47, 48).

A grande maioria das série de epilepsia hipocampal estuda populações de adultos, com vários anos de crises, sem conseguir concluir sobre a progressão.

Poucos são os estudos em crianças com EH. Atualmente, o reconhecimento de bom prognóstico associado à cirurgia em pacientes com EH e a preocupação crescente com períodos de plasticidade cerebral durante o desenvolvimento, têm levado a indicações cirúrgicas mais precoces, permitindo o estudo das alterações hipocampais também em crianças, tanto em EH como em patologias extra-hipocampais. Isso abre a perspectiva de estudo de pacientes com história mais curta de epilepsia e em diferentes faixas etárias.

### **Objetivos**

1. Demonstrar as características histopatológicas das displasias corticais focais na infância, bem como a presença de linhagens neuronal e glial em áreas de DC.

2. Estudar, através de técnica imuno-histoquímica, os circuitos excitatórios e inibitórios em DC focal pela expressão de receptores pós-sinápticos para neurotransmissores excitatórios (glutamato) e inibitórios (GABA) e presença de neurônios e terminais GABAérgicos.

3. Estudar a relação entre DC focal no neocórtex temporal e EH (dual pathology) em uma população de pacientes com epilepsia temporal submetidos a tratamento cirúrgico, através da avaliação semi-quantitativa da presença de receptores NMDAR2.

4. Estudar as características histopatológicas e de receptores pós-sinápticos no hipocampo proveniente de crianças e adolescentes submetidos a tratamento cirúrgico para epilepsia, correlacionando com idade e duração das crises.



## Bibliografia

1. Jackson JH. On a particular variety of epilepsy ("intellectual aura"), one case with symptoms of organic brain disease. In: Taylor J (ed.) Selected Writings of John Hughlings Jackson. London: Hodder and Stoughton 1931;385-405.
2. Jackson H, Beevor CE. Case of tumors of the right temporo-sphenoidal lobe bearing on the localization of the sense of smell and on interpretation of a particular variety of epilepsy. Brain 1889;12:346-357.
3. Jackson H, Colemann WS. Case of epilepsy with tasting movements and "dreamy state"- very small patch of softening in the left uncinate gyrus. Brain 1890;25:580-585.
4. Bouchet and Czauvieilh. De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'alienation mentale. Recherche sur la nature et le siège de ces deux maladies: mémoire Qui a remporté le prix au concours établi par. Arch Gen Med 1825;9:510-42.
5. Meynert T. Studien über das pathologisch-anatomische Material der Wiener Irren-Anstalt. Vierteljahrssch Psychiat 1967;3:381-402.
6. Margerison JH, Corsellis JAN. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. Brain 1966;89:499-530.
7. Penfield W, Flanigin H. Surgical therapy of temporal lobe seizures. Arch Neurol Psychiat 1950;64:491-500.
8. Falconer MA. Discussion of the surgery of temporal lobe epilepsy: surgical and pathological aspects. Proc Royal Soc of Med 1953;46:971.
9. Babb TJ & Brown WJ. Pathological findings in epilepsy. In: Engel J Jr, ed. Surgical treatment of epilepsy. New York: Raven Press, 1987:511-540.
10. Bruton CJ, Steves JR, Frith CD. Epilepsy, psychosis and schizophrenia: clinical and neuropathological correlations. Neurology 1994;44:34-42.
11. Prayson RA, Estes ML. Cortical dysplasia: A histopathologic study of 52 cases of partial lobectomy in patients with epilepsy. Hum. Pathol. 1995;26:493-500.

12. Taylor DC, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JAN. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1971; 34:369-387.
13. Vinters HV, Armstrong DL, Babb TL, Daumas-Duport C, Robitaille CJ, Farrell MA. The neuropathology of human symptomatic epilepsy. In: Engel J Jr, ed. *Surgical Treatment of epilepsies*. New York: Raven Press, 1993; 593-608.
14. Barbosa-Coutinho LM, Hilbig A, Calcagnotto ME, Paglioli E, Pagliolo-Neto E, Costa JC, Palmini A, Paula EC. Neuropatologia das Epilepsias de difícil controle. Estudo de 300 casos consecutivos. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 1999;57(2-B):405-414.
15. Wyllie E, Comair YG, Kotagal P, Bulacio J, Bingaman W, Ruggieri P. Seizure Outcome after Epilepsy Surgery in Children and Adolescents. *Ann Neurol* 1998;44:740-748.
16. Farrell MA, DeRosa MJ, Curran JG, Secor DL, Cornford ME, Comair YG, Peacock WJ, Shields WD, Vinters HV. Neuropathological findings in cortical resections (including hemispherectomies) performed for the treatment of intractable childhood epilepsy. *Acta Neuropathol* 1992;83:246-259.
17. Mischel PS, Nguyen LP, Vinters HV. Cerebral Cortical Dysplasia Associated with Pediatric Epilepsy. Review of Neuropathologic Features and Proposal for a Grading System. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1995;54(2):137-53.
18. Barth PG. Disorders of Neuronal Migration. *The Canadian Journal Of Neurological Sciences* 1987;14(1):1-16.
19. Palmini A, Andermann F, Olivier A, Tampieri D, Robitaille Y, Andermann E, Wright G. Focal neuronal migration disorders and intractable partial epilepsy: a study of 30 patients. *Ann Neurology* 1991;30: 741-49.
20. Sarnat HB. Cerebral cortical development: normal and pathologic process. In: *The treatment of epilepsy: Principle and Practice* (E. Wyllie, ed.) Lea & Febiger, Philadelphia 1993.
21. Palmini A. Disorders of Cortical Development. *Current Opinion in Neurology* 2000;13:183-192.



22. Kasper BS, Stefan H, Buchfelder M, Paulus W. Temporal Lobe Microdysgenesis in Epilepsy Versus Control Brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58(1):22-28.
23. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate Receptors in the Mammalian Central Nervous System. *Progress in Neurobiology*. 1998;54: 581-618.
24. Dichter MA, Wilcox KS. Excitatory Synaptic Transmission. In: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, Engel J and Pedley TA., eds, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.
25. Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*. 1994;17:31-108.
26. Ying Z, Babb TL, Comair YG, Bingaman W, Bushey M, Touhalisky K. Induced Expression of NMDAR2 Proteins and Differential Expression of NMDAR1 Splice Variants in Dysplastic Neurons of Human Epileptic Neocortex. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1998;51(1):47-62.
27. Spreafico R, Battaglia G, Arcelli P, Andermann F, Dubeau F, Palmieri A, Olivier A, Villemure JG, Tampieri D, Avanzini G, Avoli M. Cortical Dysplasia: An immunocytochemical study of three patients. *Neurology* 1998;50:27-36.
28. Hilbig A, Babb TL, Najm I, Ying Z, Wyllie E, Bingaman W. Focal Cortical Dysplasia in Children. *Dev Neurosci* 1999;21:271-280.
29. Babb TL, Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK, Yeoman KM, Kuhlman PA. Glutamate AMPA receptors in the fascia dentata of human and kainate rat hippocampal epilepsy. *Epilepsy Research* 1996;26:193-205.
30. Mathern GW, Leite JP, Babb TL. Aberrant hippocampal mossy fiber sprouting correlates with greater NMDAR2 receptor staining. *Neuroreport* 1996;7:1029-35.
31. Patel S, Chapman AG, Graham JL, Meldrum BS, Frey P. Anticonvulsant activity of the NMDA antagonist in a rodent and a primate model of reflex epilepsy. *Epilepsy Res* 1990;7:3-10,

32. Palmini A, Gambardella A, Andermann F, Dubeau F, Da Costa JC, Olivier A, Tampier D, Gloor P, Quesney F, Andermann E. Intrinsic epileptogenicity of human dysplastic cortex as suggested by corticography and surgical results. *Ann Neurol* 1995;37:476-487.
33. Morioka T, Nishio S, Ishibashi H. Intrinsic epileptogenicity of focal cortical dysplasia as revealed by magnetoencephalography and electrocorticography. *Epilepsy Res* 1999;33:177-187.
34. Ying Z, Babb TL, Mikuni N, Najm I, Drazba J, Bingaman W. Selective co-expression of NMDAR2A/B and NMDAR1 subunit proteins in dysplastic neurons of human epileptic cortex. *Exp Neurology* 1999;159(2):409-18.
35. Mikuni N, Babb TL, Ying Z, Najm I, Nishiyama K, Wylie C, Yacubova K, and Okamoto T. NMDA receptor 1 and 2A/B coassembly increased in human epileptic focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 1999;40(12):1683-7.
36. Babb TL, Brown WJ, Pretorius J, Davenport C, Lieb JP, Crandall P. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1984;25:729-740.
37. Mathern GW, Leite JP, Babb TL, Pretorius JK, Kuhlman PA, Mendonza D, Fried I, Sakamoto AC, Assirati JÁ, Adelson PD, Peacock WJ. Aberrant hippocampal mossy fiber sprouting correlates with greater NMDAR2 receptor staining. *Neuroreport* 1996;7:1029-1035.
38. Babb TL, Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK, Yeoman KM, Kuhlman PA. Glutamate AMPA receptors in the fascia dentata of human and kainate rat hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res*, 1996;26:193-205.
39. Lynd-Balta E, Pilcher WH, Joseph AS. Distribution of AMPA receptor subunits in the hippocampal formation of temporal lobe epilepsy patients. *Neuroscience* 1996;72:15-29.
40. Bruton CJ, Steves JR, Frith CD. Epilepsy, psychosis and schizophrenia: clinical and neuropathological correlations. *Neurology*. 1994;44:34-42.



41. Levesque MF, Nakasato N, Vinters HV, Babb TL. Surgical treatment of limbic epilepsy associated with extrahippocampal lesions: the problem of dual pathology. *J Neurosurg* 1991;75: 364-370.
42. O'Brien TJ, Kilpatrick C, Murrie V, Vogrin S, Morris K, Cook MJ. Temporal lobe epilepsy caused by mesial temporal sclerosis and temporal neocortical lesions. A clinical and electroencephalographic study of 46 pathologically proven cases. *Brain* 1996;119: 2133-2141.
43. Ho SS, Kuzniecky SI, Giliam F, Faught F, Morawetz R. Temporal lobe developmental malformation and epilepsy. Dual pathology and bilateral hippocampal abnormalities. *Neurology* 1998;50:748-54.
44. Cendes F, Cook MJ, Watson C, Andermann F, Fish DR, Shorvon SD, Bergin P, Free S, Dubeau F, Arnold DL. Frequency and characteristics of dual pathology in patients with lesional epilepsy. *Neurology* 1995;45:2058-2064.
45. Raymond AA, Fish DR, Stevens JM, Cook MJ, Sisodaya SM, Shorvon SD. Association of hippocampal sclerosis with cortical dysgenesis in patients with epilepsy. *Neurology* 1994;44:1841-1845.
46. Fernández G, Effenberg O, Vinz B, Steinlein O, Elger CE, Döhring W. Hippocampal Malformation as a cause of familial febrile convulsion and subsequent hippocampal sclerosis. *Neurology* 1998;50:909-917.
47. Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 1993;39:985-995.
48. Okazaki MM, Evenson DA, Nadler JV. Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: visualization after retrograde transport of biocytin. *J Comp Neurol* 1995;352(4):515-534.

# Focal Cortical Dysplasia in Children

Arlete Hilbig<sup>a</sup> Thomas L. Babb<sup>a,b</sup> Imad Najm<sup>b</sup> Zhong Ying<sup>a</sup>  
Elaine Wyllie<sup>b</sup> William Bingaman<sup>c</sup>

Departments of <sup>a</sup>Neurosciences, <sup>b</sup>Neurology and <sup>c</sup>Neurosurgery, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio, USA

## Key Words

Focal cortical dysplasia · Pediatric epilepsy · Glutamate receptors ·  $\gamma$ -Aminobutyric acid receptors · Glutamate decarboxylase · Microtubule-associated protein 2

## Abstract

Cortical dysplasia (CD) is now recognized as one of the major causes of pediatric focal neocortical epilepsy, and surgical procedures have been considered early in life. However, the mechanisms involved in seizure generation and intractability in these patients are still unknown. We analyzed with immunocytochemistry for various antibodies the brain tissue from 4 children (10 months to 6 years old) with focal epilepsy due to focal CD in order to study the inhibitory and excitatory circuits in dysplastic areas. Our group had similar histopathological and clinical characteristics. In all patients we found areas of cortical disorganization with dysplastic neurons and balloon cells. We studied distributions of glial cells with glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neurons with microtubule-associated protein 2 (MAP-2). Gliosis was present in all cases, and GFAP stained also some balloon cells. Dysplastic neurons were darkly stained by MAP-2, and we also found balloon cells weakly stained with MAP-2 in the same areas where GFAP was positive, suggesting coexpression of neuronal and glial markers in some of

these cells. There was an increased expression of glutamate receptors, especially GluR2/3, but also N-methyl-D-aspartate receptors in dysplastic cortex. The inhibitory circuit does not seem to be decreased, rather we notice an increased amount of glutamate-decarboxylase-positive terminals around some of the big neurons. We discuss the possible role of these findings as mechanisms of epilepsy.

Copyright © 1999 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Since the first detailed description of focal cortical dysplasia (CD) by Taylor et al. in 1971 [1] in patients with temporal lobe epilepsy, an increasing number of reports have been found in the literature [2–9], and this pathology is one of the most common in epileptic neurosurgical specimens. This is especially true if we take into account that there is an association of CD with some slow-growing tumors [4, 5]. The high number of patients submitted to surgery is due to the frequent medical intractability of CD. The epilepsy syndromes associated with CD usually start in young children, and surgical treatment has been considered early in life, allowing the study of brain tissue from patients with short histories of seizures and fewer years of antiepileptic drugs (AEDs) than an adult popula-

## KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 1999 S. Karger AG, Basel

Accessible online at:  
www.karger.com/journals/dnc

Arlete Hilbig, MD  
Department of Neurosciences, NC-30  
9500 Euclid Avenue  
Cleveland, OH 44195 (USA)  
Tel. +1 216 445 2690, Fax +1 216 444 7927, E-Mail hilbiga@ccf.org



**Table 1.** Clinical profile

Patient code	Side	Age	First seizures	Gender	Epilepsy classification	Associated conditions	Magnetic resonance imaging
1222981	L	6 years 10 months	2 years	F	Left frontal lobe epilepsy	None	Abnormal signal in the middle and posterior medial left frontal lobe
0319971	L	10 months	7 weeks	M	Left perirolandic epilepsy	Mild developmental delay; right hemiparesis	Deep cleft of thickened gray matter in the left posterior frontal lobe
1218971	R	22 months	1 day	M	Right temporoparietal epilepsy	None	Right temporoparietooccipital cortical dysgenesis with thickened gyri and abnormal sulcation
0225991	L	28 months	10 months	F	Left frontal epilepsy	Mild language delay	Cerebral dysgenesis with disturbed gray-white matter junction in the left inferior frontal polar region

L = Left; R = right; M = male; F = female.

tion. In this group of patients we have probably the best opportunity to study mechanisms of seizure generation without too many intervening influences. Also, this group has highly epileptogenic tissue associated with the severest forms of epilepsy. CD is a term used for a combination of disturbed neuronal migration and abnormal neuroglial differentiation [10]. There is a range of morphological abnormalities related to disturbed neocortical development called CD [4, 5, 8]. These lesions can be identified by imaging analyses such as MRI, but normal MRI studies may also show dysplastic areas [11]. Although some data support the idea that the cortical dysplastic lesions are the source of epileptogenicity [12], the mechanism by which these lesions become epileptogenic and why they are so often refractory to medical treatment is still unknown. One possible explanation is the modification of membrane properties of dysplastic neurons by change in or maintenance of immature forms of postsynaptic receptors.

The differential expression of subunits of glutamate receptors (GluRs) in dysplastic cortex from an adult population has recently been described [13]. The authors showed increased expression of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptor subunits GluR2/3, N-methyl-D-aspartate receptor 1 (NMDAR1) subunits and preferential expression of NMDAR2 subunits A and B in dysplastic neurons. Another group [14] described a decreased distribution of calcium-binding proteins in neurons and the expression of some subunits of GluRs in 3 patients with severe forms of CD, again in an adult population.

The aim of the present study is to demonstrate the histopathological characteristics of focal CD and the expres-

sions of subunits of GluRs and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptors in a population of children submitted to epilepsy surgery based on common preoperative diagnoses.

### Material and Methods

We studied the resected cortex from 4 children operated at the Cleveland Clinic Foundation for medically intractable epilepsy whose histopathological examination showed focal CD as characterized below. The clinical profiles and imaging studies are described in table 1.

All our tissue was studied with cresylecht violet staining and immunocytochemistry (ICC) with different antibodies as described in table 2. We used glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a marker of glial cells to study their presence and distribution in dysplastic areas. Microtubule-associated protein 2 (MAP-2) was used as a marker of neurons. MAP-2 is one of the major neuronal cytoskeletal proteins and has a crucial role in neuronal microtubule assembly. These MAPs also play an important role in the sprouting, branching and regeneration of neuronal processes [15]. Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the brain, and we used ICC for GluR subunits including AMPA receptors (GluR2/3) and NMDA receptors (NR1 and NR2A/B) to study the distribution of excitatory receptors in CD areas. We also studied the presence on inhibitory neurons with antibodies: anti-GABA-A $\beta$  receptors and anti-glutamate-decarboxylase (GAD). GAD is the rate-limiting synthetic enzyme for GABA and is located exclusively in GABAergic neurons, both in cytoplasm and terminals [16].

#### Tissue Processing

All tissue was processed with the same timing and temperature, and with the same reagents to avoid technical variance. We received fresh tissue from the operating room and several blocks were made to sample the neocortical resection. The blocks were fixed for 36–48 h in 4% paraformaldehyde at 4°C, cryoprotected in 20% buffered sucrose, and cryostat sections were cut at 30  $\mu$ m. Neocortical samples



**Table 2.** Antibodies used in this study

Antibody and type	Source	Concentration	Specificity
GFAP (monoclonal)	Boehringer Mannheim	2 µl/ml	glial fibrillary acidic protein
MAP-2 (monoclonal)	Boehringer Mannheim	0.5 µl/ml	microtubule-associated protein 2
GluR2/3 (polyclonal)	Chemicon	4 µg/ml	carboxyl terminal sequence of GluR2 and GluR3
NMDAR1 (monoclonal)	Pharmingen	2.5 µg/ml	transmembrane region of all 8 splice variants of NMDAR1
NMDAR2A/B (polyclonal)	Chemicon	5 µg/ml	C terminus of NMDAR2 types A and B
GABA-A $\beta$ (monoclonal)	Boehringer Mannheim	4 µg/ml	$\beta$ -chain of GABA-A receptor
GAD (polyclonal)	National Institute of Health	0.1 µg/ml	glutamate decarboxylase

were evaluated using cresylecht violet staining and ICC for the antibodies listed in table 2. After cryostat sections, the tissue sections were placed in individual 3-ml tissue culture wells containing 0.05 M Tris-buffered saline (TBS, pH 7.6). Free-floating sections were processed immediately and washed in TBS between each step: (1) 5 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10% methanol in TBS; (2) 60 min in 1.5% normal goat serum for blocking; (3) 18 h overnight shaking at room temperature in the primary antibody; (4) 35 min in diluted biotinylated secondary antibody (ABC kit, Vector Laboratories); (5) 0.05% 3,3'-diaminobenzidine and 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS stained the reactive complex in Petri dishes for 8 min, rinsed with cold TBS to terminate the reaction; (6) tissue sections were mounted on chromium alum gelatin-coated slides, air dried for several hours and coverslipped.

## Results

### *Clinical Profile*

The clinical profile is presented in table 1. The ages in our group ranged from 10 months to 6 years (mean: 35.5 months old; median: 25 months). All children had focal epilepsy without any other major neurological finding but mild developmental delay in 2. All of them had focal areas of dysplasia diagnosed by MRI. Three had frontal lesions, and 1 had more widespread lesions involving temporoparietaloccipital areas. All received focal cortical resections that included borders outside the MRI-defined lesion.

### *Morphological Characterization of Dysplastic Cortex Assessed by Cresylecht Violet*

The dysplastic cortex from all patients had a similar histopathology. They were characterized by a disorganized laminar cortical structure with numerous aberrant neurons each with prominent dendritic arborization (fig. 1A, B). These neurons were present throughout the cortical layers, but they were especially noticed in the gray-white matter junction and sometimes distinctly present in the subcortical white matter, giving the impres-

sion of a focally thick cortex. Some neurons had a vacuolated cytoplasm. The dysplastic cortex as well as the underlying white matter also showed cells with a pale cytoplasm with usually one but sometimes two or more displaced nuclei (balloon cells; fig. 2A). The transition between normal and dysplastic areas was gradual in all patients studies. The specimens of figure 1A and B are from the same patient's cortex as those of figure 1C and D; however, the former are so remote from the EEG focus (fig. 1C, D) that the cortical laminae are virtually normal in appearance and virtually all the pyramidally shaped cells appear normal with apical dendrites oriented to the pial surface.

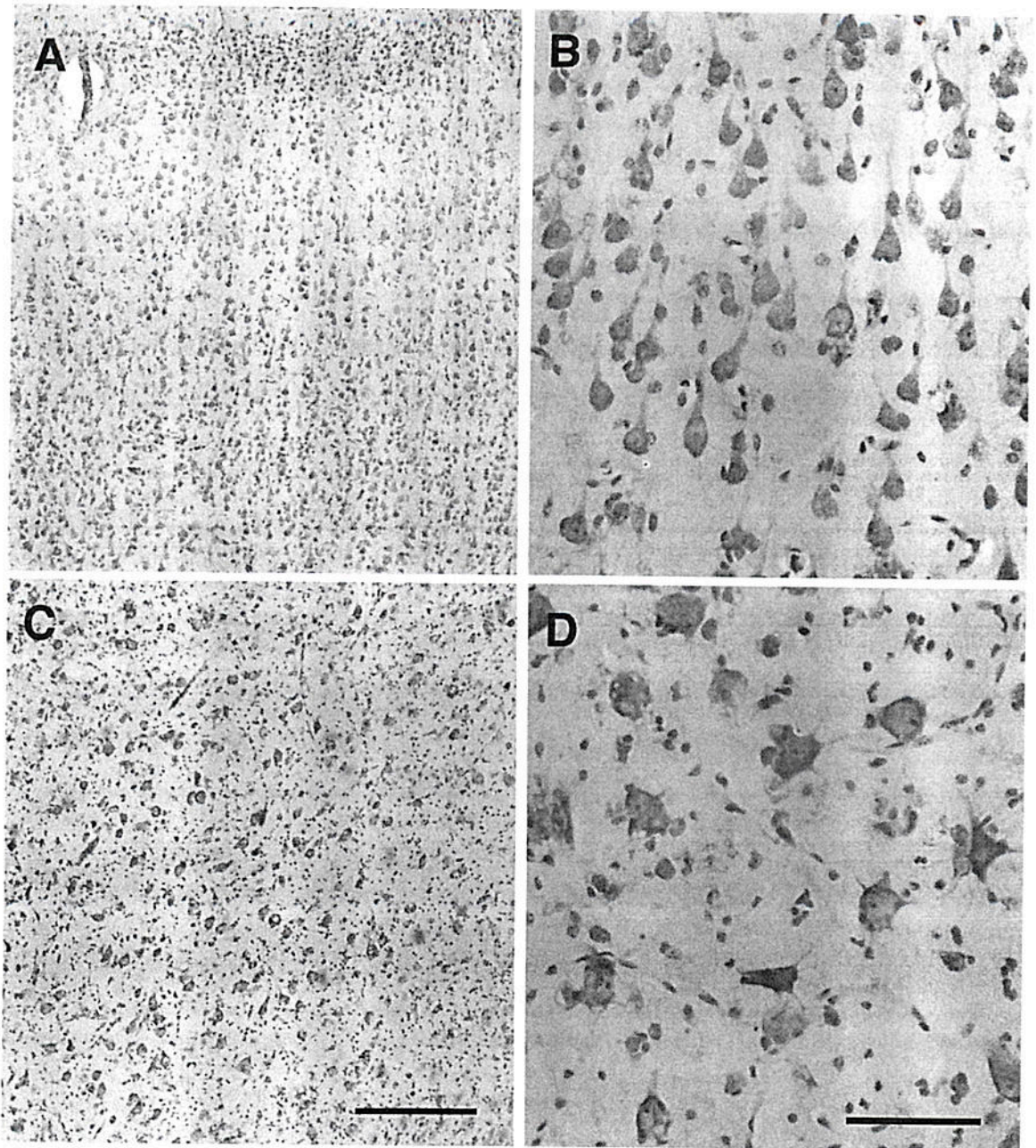
### *Immunocytochemistry*

GFAP stains were performed in 3 patients. Gliosis was found in all of them, most marked in cortical areas within a concentration of dysplastic neurons and underlying white matter. The balloon cells showed variable positivity for GFAP (fig. 2B), some with darker and more homogeneous staining than others, but most of them with no definitive GFAP staining.

MAP-2 is a well-defined marker for neurons, and 2 patients had specimens stained with MAP-2. The neurons showed immunoreactivity in both the dendrites and perikaryon. In normal-appearing cortex, the apical dendrites were better stained than the cell body. In areas of dysplasia, the concentration of MAP-2 in dendrites was decreased and the large, misshapen neurons had intense staining in the cell body and thick dendrites were darkly stained (fig. 3B). Occasionally we found balloon cells and even astrocyte-appearing 'cells' weakly stained for MAP-2 (fig. 3C, D) which indicates that at least some of these cells might have a commitment to be a neuron.

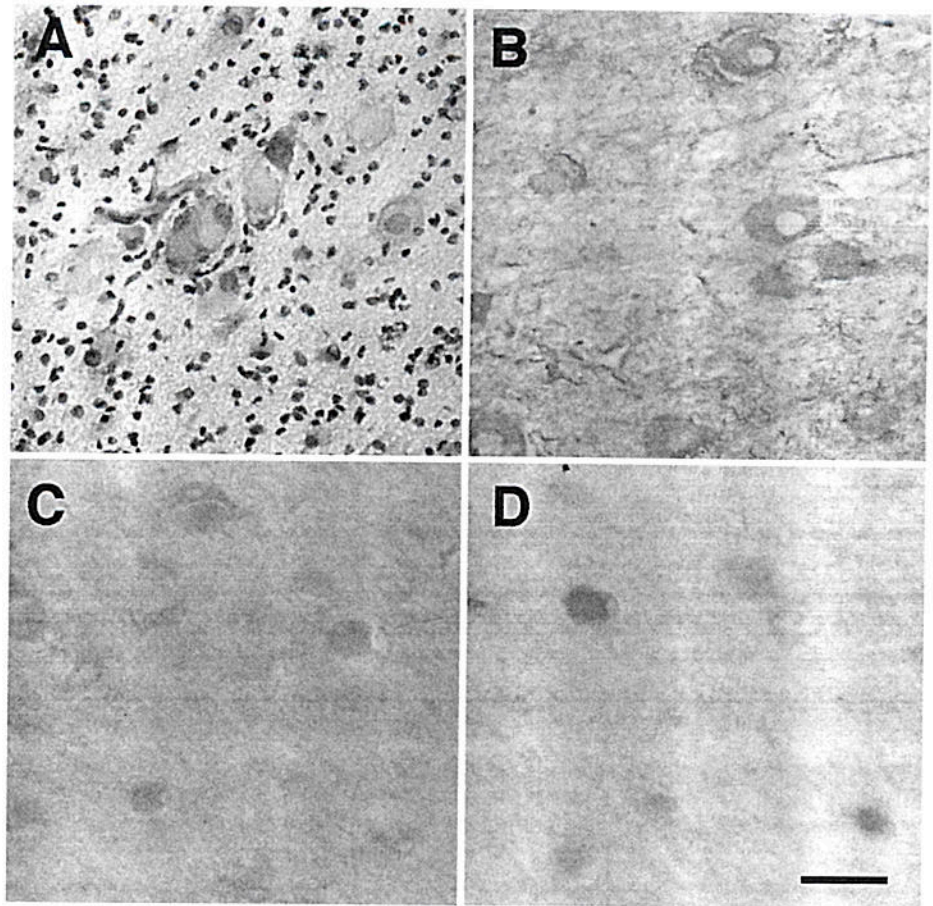
Both 'normal' and dysplastic neurons showed immunoreactivity to an NMDAR1 antibody, although some dysplastic neurons showed more intense staining than





**Fig. 1.** Photomicrographs of different areas resected from the frontal lobe of the same patient (1222981) stained with cresylt violet. **A** Area far from the lesion showing roughly normal cortex. We can differentiate layers 1, 2, 3 and 4. **B** Magnification of layer 3 showing neurons with normal size and shape. **C** Area of focal CD located in the medial frontal lobe which was also the most spiking area verified by subdural grids. Macroscopically we found a poor definition between cortex and white matter. Microscopically we can see that there is no cortical lamination and there are numerous big, misshapen neurons throughout the cortex. In the transition between white and gray matter there were balloon cells. **D** Magnification from **C** showing dysplastic neurons pointing in different directions, with a large cytoplasm and numerous small processes. **A, C** Scale bar = 300  $\mu$ m. **B, D** Scale bar = 80  $\mu$ m.





**Fig. 2.** Photomicrographs of balloon cells from different patients and with various staining. **A** White matter from frontal lobe stained with cresylecht violet. These cells have an ill-defined membrane and pale cytoplasm, without Nissl substance. **B** GFAP ICC staining in the gray-white matter junction from temporal lobe. **C** NR1 ICC with cytoplasmic staining in various cells. **D** NR2A/B also showed staining in the cytoplasm of balloon cells. **A–D** Scale bar = 40  $\mu$ m.

normal ones. NMDAR1 is probably an obligatory component of NMDA receptors [17] and is expressed in almost all cortical neurons. In contrast to non-NMDA receptors, which are present also in glial cells, these receptors are only present in neurons, being also a good marker for neurons. This glutamate subunit was expressed in the balloon cells with less intensity than nondysplastic and dysplastic neurons (fig. 2C), implying again that some of these cells might have neuronal function. NR2A/B stained some scattered dysplastic neurons. It also stained balloon cells (fig. 2D). In all patients GluR2/3 was used to stain both nondysplastic and dysplastic neurons and it was more highly expressed in dysplastic neurons when compared with 'normal' neurons (fig. 4). This AMPA antibody recognizes both subunits, GluR2 and GluR3. It appeared that these AMPA receptor subunits are the most up-regulated in the dysplastic neurons in this population. It also lightly stained some balloon cells.

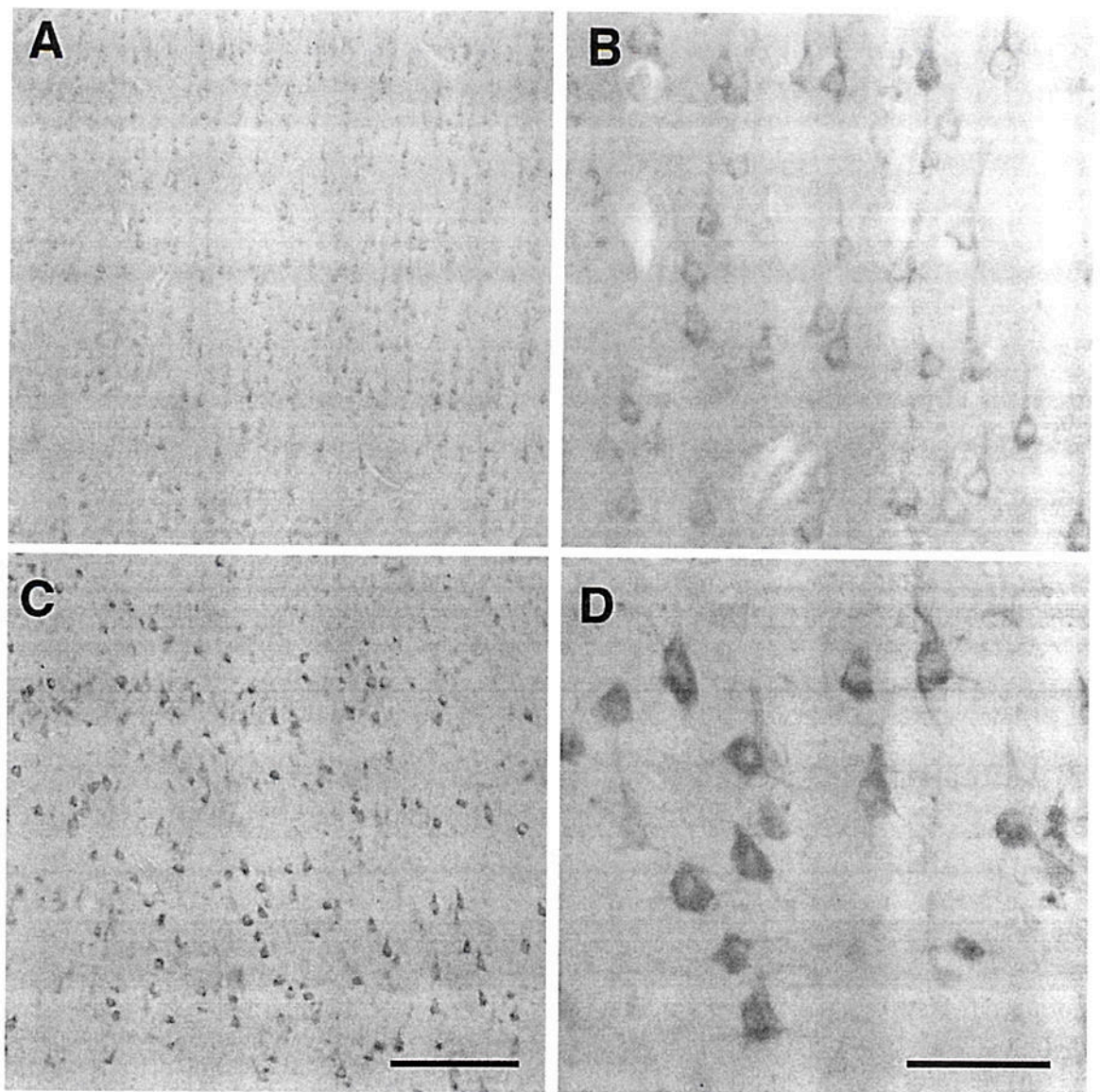
The inhibitory neurons were studied with GAD which was present in the cytoplasm of GABAergic neurons

throughout cortical layers and in terminals in the gray matter of normal-appearing areas (fig. 5A, B). In some dysplastic areas, this antibody was mainly concentrated in terminals around big cells located in the transition between gray and white matter, where we also found a high concentration of GABA-A $\beta$  receptors (fig. 5C–F) suggesting a functional and increased inhibitory circuit in these areas.

### Discussion

The improvement of neuroimaging studies has led to the recognition that probably the most common cortical lesion in patients with epilepsy is CD. Because patients with CD are refractory to medical treatment, the numbers of patients, especially children, submitted to surgery have increased. Also the development of new techniques and new antibodies to study brain tissue makes it possible to study structural and functional correlations to increase





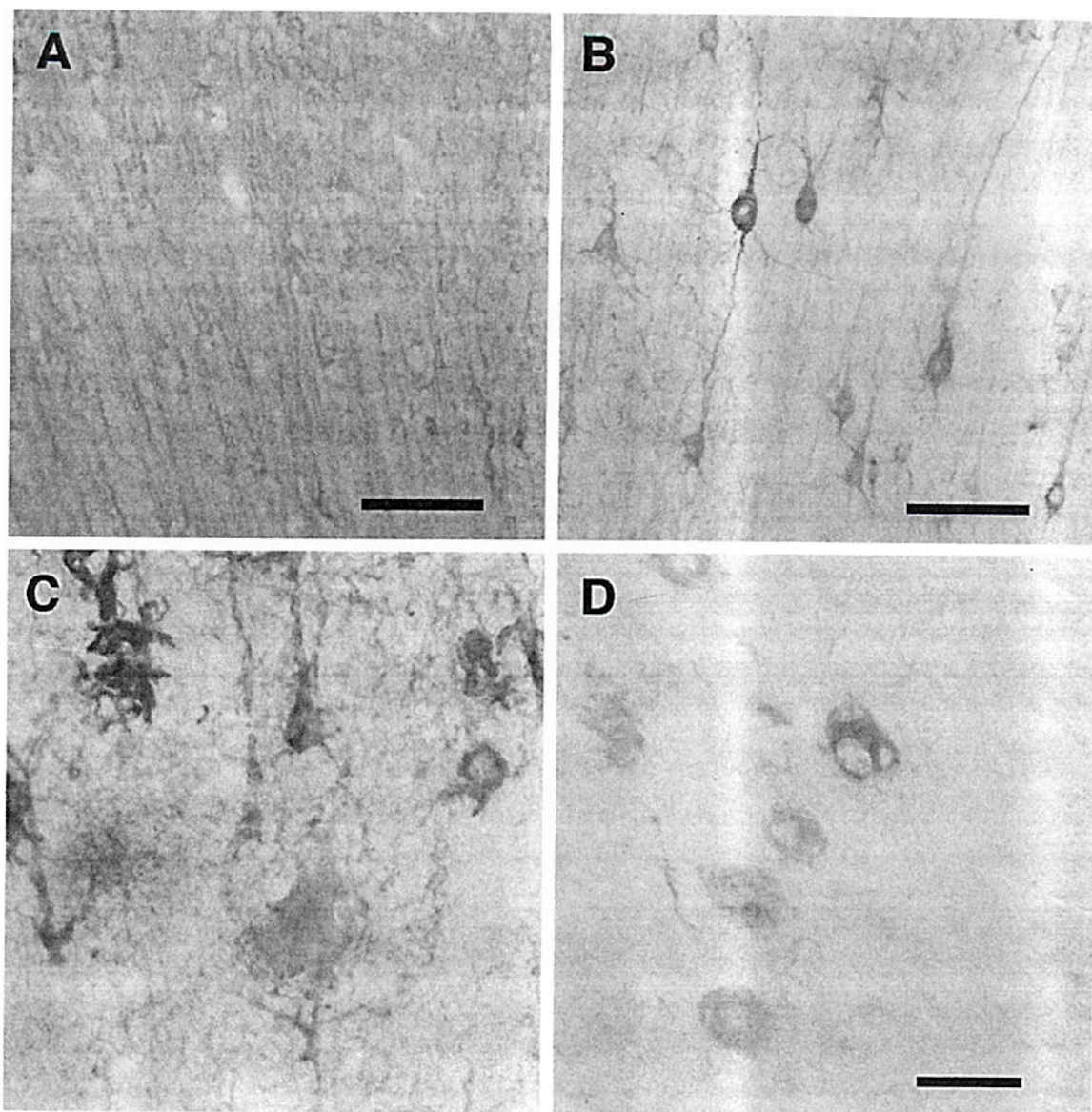
**Fig. 3.** MAP-2 ICC staining from different areas of the left inferior frontal lobe of patient 0225991. **A** Area close to the lesion but still with almost normal-appearing cortex, showing the pattern of staining with MAP-2 preferentially located in apical dendrites and also in perikaryon. **B** Area of dysplasia with big neurons darkly stained, both in dendrites and cytoplasm. There is a decrease in 'normal' dendrites in these areas. **C** In the gray-white matter junction we found some cells that resemble astrocytes stained with MAP-2, which is a neuronal marker. **D** Deep in the white matter some of the balloon cells also showed immunoreactivity, weaker than nondysplastic and dysplastic neurons. **A, C** Scale bar = 100  $\mu$ m. **B, D** Scale bar = 40  $\mu$ m.

our knowledge about possible mechanisms of epilepsy in patients with CD. Just recently reports have been directed toward mechanisms of cortical dysplasia and focal epilepsy [13, 14, 18], but few have studied children with a variety of techniques to test specific hypotheses.

We studied 4 young children with very similar clinical profiles and histopathological characteristics in order to

describe the distribution of excitatory and inhibitory neurons in these patients. In areas of dysplasia we found some striking characteristics already described in earlier morphological studies such as the presence of disorganized architecture with large dysplastic neurons, some with cytoplasmic vacuolization, and the presence of balloon cells. These findings probably represent early develop-



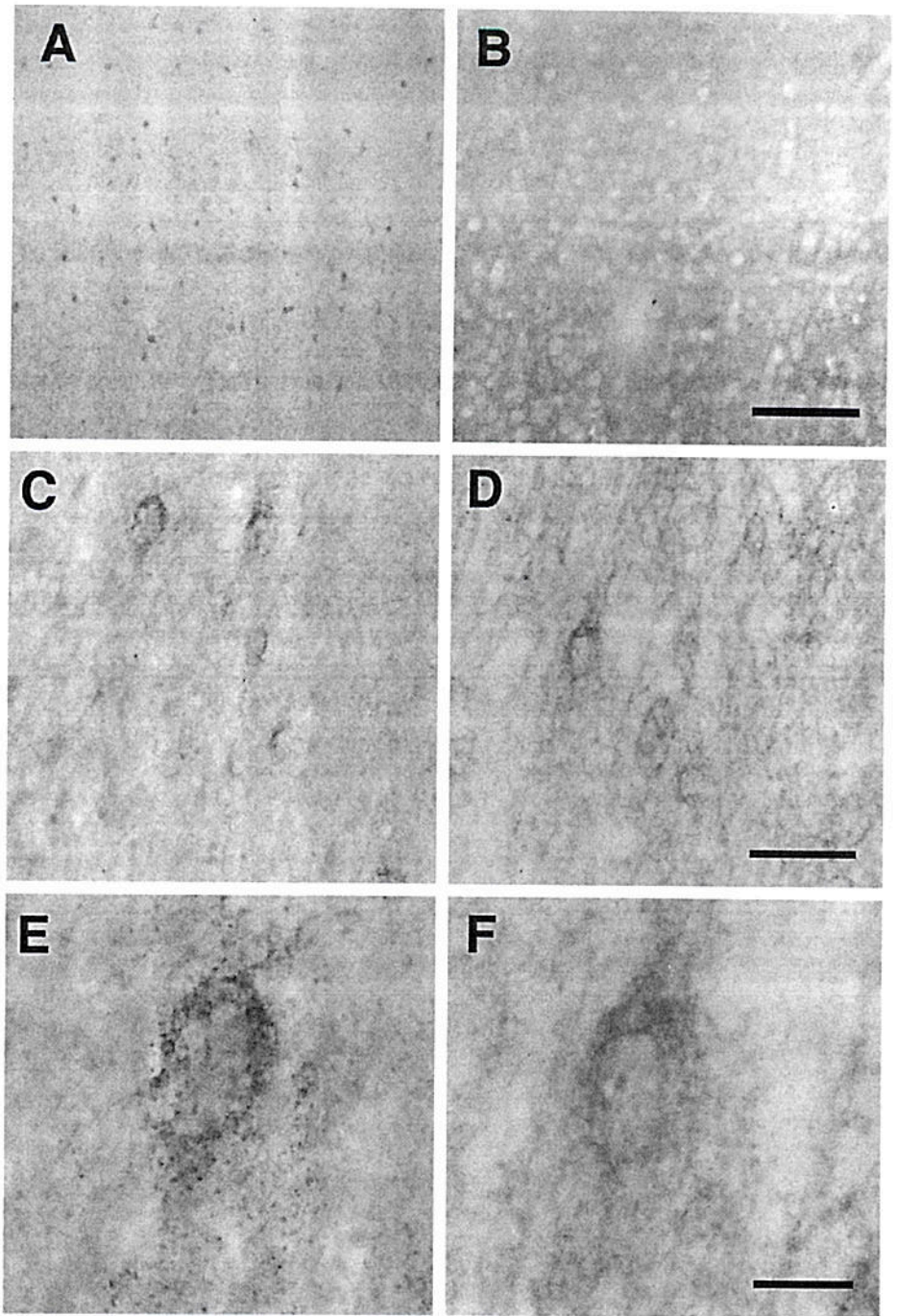


**Fig. 4.** GluR2/3 ICC staining in different areas from the frontal lobe of patient 1222981 (same regions as in fig. 1). **A** Normal-appearing cortex with neurons stained in cytoplasm and dendrites. **B** Magnification of layer 3 showing normal neurons with apical dendrite pointing to pial surface. **C** Area of focal cortical dysplasia with dysplastic neurons darkly stained for GluR2/3. **D** Magnification from **C** showing big, dysplastic neurons with processes pointing in different directions and with dark staining for this antibody. **A** Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ . **B** Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . **C, D** Scale bar = 80  $\mu\text{m}$ .

mental disruption and are considered severe forms of CD [8]. In our study, the dysplastic neurons stained darkly for MAP-2 antibody both in the cytoplasm and in the dendrites while in more normal-appearing cortex the staining was preferentially in the dendrites. The dendrites of the dysplastic neurons were usually thick and darkly stained with MAP-2, but we found a decreased amount of 'nor-

mal' dendrites in dysplastic areas which might indicate the presence of persistent regeneration or remodeling of neuronal processes in the big neurons and a lack of development of more mature connections in the same area. It has recently been suggested that early forms of MAPs are the ones responsible for the strong immunoreactivity with MAP-2 [15, 19]. It is possible that these cells are perma-





**Fig. 5.** Photomicrograph from frontal lobe. **A** Normal-appearing cortex stained with GAD ICC showing small GABAergic neurons throughout layers 2–4. **B** From an area close to **A**, the pattern of staining with GABA-A $\beta$  ICC located mainly in dendrites. **C, E** Dysplastic area showing an increased amount of GAD immunoreactivity in terminals around big cells. **E, F** Same areas as in **C, E**; we can notice the presence of GABA-A $\beta$  receptors in these cells. **A, B** Scale bar = 200  $\mu$ m. **C, D** Scale bar = 100  $\mu$ m. **E, F** Scale bar = 20  $\mu$ m.

nently forming new and aberrant connections. The big, dysplastic neurons also had strong immunoreactivity for GluR2/3, which recognizes two different AMPA receptor subunits (GluR2 and GluR3) with different functional properties. GluR2 is the subunit that provides calcium impermeability to the receptor complex [17, 20]; how-

ever, our studies cannot determine how effective or typical the GluR2 component remains in dysplastic neurons. Some of these cells also express NMDA receptors, both NR1 and NR2A/B. The expression of these receptors seems to be developmentally regulated [17]. It has been demonstrated that the coassembly of NR1 with NR2A/B



in the same receptor complex increases current through the NMDA channel [17,20]. Studies with double labeling [18] have indicated that the presence of both subunits in the same cell occurs only in dysplastic areas. Hence, these cells might have an immature pattern of postsynaptic receptors that lead to increased hyperexcitability.

Another important characteristic of these dysplastic areas was the presence of abnormal cell types usually called balloon cells, which have a pale cytoplasm and an ill-defined cellular membrane. Some of these cells resemble gemistocytic astrocytes. They do not show Nissl substance but have variable immunoreactivity to GFAP. It had previously been described [3–5], and we found in our study, that some of these cells are positive for GFAP, indicating that at least some might have commitment to be astrocytes. However, most of these cells are negative to this glial marker, and we found some balloon cells weakly stained for MAP-2, which is a neuronal marker. The balloon cells also showed immunoreactivity to NMDA receptors, both NR1 and NR2A/B, which are present only in neurons. Some balloon cells also express the AMPA receptor GluR2/3, which is present in most of the neurons and was also described in culture of astrocytes [21]. We can conclude that at least some of these balloon cells might have neuronal function, probably excitatory neurons, increasing the excitatory pool in areas of dysplasia. It was described, using a double labeling technique, that some of the balloon cells express both synaptophysin and GFAP [22]. Hence, there might also be some functional overlap in these cells. The astrocytes play a fundamental role in the synaptic transmission being responsible for keeping low levels of neurotransmitters in the synaptic cleft and providing glutamine (glutamate-glutamine cycle) to de novo synthesis of glutamate and GABA [21]. In CD we have both neuronal and glial abnormal development and the presence of 'immature' astrocytes might impair this important function. Secondly, it is possible that the balloon cells are evidence that undifferentiated cells carry an antigenic site for both neuronal and glial lineage that regress as the neuronal phenotype matures during migration and development.

Another important feature of our study is the rich inhibitory net that we found around some big cells in the dysplastic areas, especially located between gray and white matter (fig. 5). In nondysplastic cortex GAD-positive neurons are distributed throughout the cortex and the thin axons and the terminals run throughout the different layers. By contrast, in dysplastic regions, the big neurons have GABA-A $\beta$  receptors and increased GAD terminal immunoreactivity around them, suggesting inhibition of

these neurons. It appears that these cells are hyperinnervated by GABAergic neurons, which was previously described in focal epileptic hippocampus [23] and might contribute to synchronizing the membrane potentials of groups of these cells and trigger seizure generation.

In conclusion, there are various morphological and functional alterations in areas of dysplasia that probably lead to an exuberant excitatory circuit. The inhibitory system does not seem to be decreased, rather we had the impression that the concentration of inhibitory circuits around some big neurons might serve to control the hyperexcitability, although because this brain region was so epileptic, it is also possible that increased inhibitory networks might contribute to the development of seizures.

### Acknowledgments

The authors thank the Pediatric Epilepsy Surgery Program and the Clinical Neurophysiology Laboratory for the precise preoperative diagnoses made on the patients reported in this paper. The research on resected human brain was approved by the Institutional Review Board (approval No. IRB 1263). This work was supported by National Institutes of Health grants NS-31655 and NS-38150 to T.L.B. and KO8 NS-02046 to I.N. We also thank CHPq (Brazil) for supporting A.H.



## References

- 1 Taylor DC, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JAN: Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1971; 34:369-387.
- 2 Barth PG: Disorders of neuronal migration. *Can J Neurol Sci* 1987;14:1-16.
- 3 Farrell MA, DeRosa MJ, Curran JG, Secor DL, Cornford ME, Comair YG, Peacock WJ, Shields WD, Vinters HV: Neuropathological findings in cortical resections (including hemispherectomies) performed for the treatment of intractable childhood epilepsy. *Acta Neuropathol* 1992;83:246-259.
- 4 Vinters HV, DeRosa MJ, Farrell MA: Neuropathologic study of resected cerebral tissue from patients with infantile spasms. *Epilepsia* 1993;34:772-779.
- 5 Wolf HK, Wiestler OD: Surgical pathology of chronic epileptic seizure disorders. *Brain Pathol* 1993;3:371-380.
- 6 Palmieri A, Andermann F, Olivier A, Tampieri D, Robitaille Y, Andermann E, Wright G: Focal neuronal migration disorders and intractable partial epilepsy: A study of 30 patients. *Ann Neurol* 1991;30:741-749.
- 7 Wyllie E, Baumgartner C, Prayson R, Estes M, Comair Y, Kosalko J, Skibinski C: The clinical spectrum of focal cortical dysplasia and epilepsy. *J Epilepsy* 1994;7:303-312.
- 8 Mischel PS, Nguyen LP, Vinters HV: Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy: Review of neuropathologic features and proposal for a grading system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54:137-153.
- 9 Prayson RA, Estes ML: Cortical dysplasia: A histopathologic study of 52 cases of partial lobectomy in patients with epilepsy. *Hum Pathol* 1995;26:493-500.
- 10 Honavar M, Meldrum BS: Epilepsy; in Graham DI, Lantos PL (eds): *Greenfield's Neuropathology*. London, Arnold, 1997, vol 2, pp 931-971.
- 11 Kuzniecky R, Murro A, King D: Magnetic resonance imaging in childhood intractable partialis epilepsies: Pathologic correlation. *Neurology* 1993;43:681-687.
- 12 Palmieri A, Gambardella A, Andermann F, Dubeau F, da Costa JC, Olivier A, Tampieri D, Gloor P, Quesney F, Andermann E: Intrinsic epileptogenicity of human dysplastic cortex as suggested by corticography and surgical results. *Ann Neurol* 1995;37:476-487.
- 13 Ying Z, Babb TL, Comair YG, Bingaman W, Bushey M, Touhalisky K: Induced expression of NMDAR2 proteins and differential expression of NMDAR1 splice variants in dysplastic neurons of human epileptic neocortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;51:47-62.
- 14 Spreafico R, Battaglia G, Arcelli P, Andermann F, Dubeau D, Palmieri A, Olivier A, Villemure JG, Tampieri D, Avanzini G, Avoli M: Cortical dysplasia: An immunocytochemical study of three patients. *Neurology* 1998;50:27-36.
- 15 Yamanouchi H, Zhang W, Jay V, Becker LE: Enhanced expression of microtubule-associated protein 2 in large neurons of cortical dysplasia. *Ann Neurol* 1996;39:57-61.
- 16 Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Brown WJ: Distribution of glutamate decarboxylase immunoreactive neurons and synapses in rat and monkey hippocampus: Light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 1988;278:121-138.
- 17 Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K: Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;54:581-618.
- 18 Ying Z, Babb TL, Staugaitis S, Drazba J, Najm I, Bingaman W, Lüders HO, Touhalisky T: NMDA receptor mechanisms in human cortical epilepsy. *Epilepsia* 1998;39:23.
- 19 Yamanouchi H, Jay V, Otsubo H, Kaga M, Becker LE, Takashima S: Early forms of microtubule-associated protein are strongly expressed in cortical dysplasia. *Acta Neuropathol* 1998;95:466-470.
- 20 Hollmann M, Heinemann S: Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:31-108.
- 21 Kimelberg HK, Jalonen TO, Aoki C, McCarthy K: Transmitter receptor and uptake systems in astrocytes and their relation with behaviour; in Laming PL, Sykova E, Reichenbach A, Hatton GI, Bauer H (ed): *Glial Cells: Their Role in Behaviour*. New York, Cambridge University Press, 1998, pp 107-129.
- 22 Vinters HV, Fisher RS, Cornford ME, Mah V, Secor DL, De Rosa MJ, Comair J, Peacock WJ, Shields WD: Morphological substrate of infantile spasms: Studies based on surgical resected cerebral tissue. *Child's Nerv Syst* 1992;8:8-18.
- 23 Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Crandall PH: Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci* 1989;9:2562-2574.

## DISPLASIAS CORTICAIS EM CRIANÇAS

Arlete Hilbig, MD; Thomas Babb, PhD; Imad Najm, MD; Zhong Ying, MD, PhD; Elaine Wyllie, MD.

### RESUMO

As displasias corticais são atualmente reconhecidas como uma das principais causas de epilepsia neocortical focal da infância e procedimentos cirúrgicos têm sido considerados precocemente nesse grupo. Entretanto, os mecanismos envolvidos na geração e intratabilidade dessas crises permanecem desconhecidos. Nós analisamos, com técnica imuno-histoquímica para vários anticorpos, o tecido cerebral ressecado de 4 crianças (10 meses a 6 anos) com epilepsia focal associada a displasia cortical com o objetivo de avaliar os circuitos inibitório e excitatório em áreas de displasia. Estudamos um grupo homogêneo tanto em relação às características clínicas como histopatológicas. Em todos os pacientes encontramos áreas de desorganização cortical com neurônios displásicos e células balonadas. A distribuição das células gliais e neurônios foi estudada com anticorpos anti-GFAP e anti-MAP2. Houve um aumento do número de células gliais em todos os casos e algumas células balonadas também foram positivas para GFAP. Os neurônios displásicos foram intensamente reativos ao MAP2. Algumas células balonadas também foram fracamente positivas com esse marcador nas mesmas áreas em que as células foram positivas para GFAP, sugerindo uma co-expressão de marcadores neuronal e glial em algumas dessas células. Encontramos um aumento da expressão de receptores de glutamato, especialmente GluR2/3, mas também receptores NMDA no córtex displásico comparado com áreas não-displásicas. O circuito inibitório não parece estar reduzido, ao contrário, pudemos observar um aumento da quantidade de terminais positivos para GAD ao redor de alguns neurônios displásicos. Os autores discutem o possível papel desses achados como mecanismo de epilepsia.



## INTRODUÇÃO

Desde a primeira descrição detalhada de displasia cortical focal (DC) em pacientes com epilepsia temporal, publicada por Taylor e col., em 1971 (1), um crescente número de relatos podem ser encontrados na literatura (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), sendo esse achado um dos mais comuns em espécimes neurocirúrgico de pacientes epiléticos. Esse fato torna-se mais relevante se considerarmos que, em casos de tumores de crescimento lento, pode existir uma associação com DC (4, 5). O elevado número de pacientes submetidos à cirurgia deve-se a freqüente intratabilidade das DC. As síndromes epiléticas associadas com DC iniciam precocemente na infância e o tratamento cirúrgico têm sido considerado cedo na vida, permitindo o estudo de tecido cerebral proveniente de pacientes com história de epilepsia de início recente e com menos tempo de uso de medicação anti-epiléptica que a população adulta. Temos, portanto, nesse grupo de pacientes, provavelmente a melhor oportunidade de estudar mecanismos de geração de crises sem muitas influências externas. Ao mesmo tempo, esses pacientes apresentam um tecido cerebral altamente epileptogênico, representando formas severas de epilepsia.

Displasia cortical é um termo usado para descrever a combinação de distúrbios da migração neuronal e diferenciação neuronal e glial anormais (10). Existe um espectro de anormalidades morfológicas relacionadas a um desenvolvimento neocortical alterado denominado DC (4, 5, 8). Essas lesões podem ser identificadas por exames de imagem tais como a Ressonância Magnética Cerebral (MRI), mas exames normais também podem mostrar áreas displásicas ao estudo histológico (11). Embora alguns estudos sustentem a idéia de que áreas de DC são a origem da epileptogenicidade (12), o mecanismo pelo qual essas lesões se tornam epileptogênicas e o porquê da freqüente intratabilidade com medicação atualmente em uso, são questões ainda desconhecidas. Uma explicação possível é que exista modificação das propriedades de membrana de neurônios displásicos por modificação ou manutenção de formas imaturas de receptores pós-sinápticos. Foi recentemente

descrito, em uma população adulta, a expressão diferenciada de subunidades de receptores de glutamato no córtex displásico (13). Os autores mostraram uma expressão aumentada de receptores AMPA GluR2/3, NMDAR1 e expressão preferencial de NR2A/B em neurônios displásicos. Outro grupo (14) demonstrou uma diminuição de proteínas ligadoras de cálcio e um aumento de receptores de glutamato em pacientes com displasia severa.

O objetivo do presente estudo é demonstrar as características histopatológicas das displasias corticais focais e a expressão de sub-unidades de receptores de glutamato e GABA em uma população de crianças submetidas a cirurgia da epilepsia baseada em um diagnóstico pré-operatório homogêneo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Nós estudamos o tecido cerebral ressecado de 4 crianças submetidas a tratamento cirúrgico na "The Cleveland Clinic Foundation" por epilepsia refratária ao tratamento clínico, cujo diagnóstico histopatológico mostrou DC como caracterizado abaixo. O perfil clínico e estudos de imagem são descritos na tabela 1.

O tecido foi estudado utilizando coloração com Cresyl-violeta e imunohistoquímica (ICC) com diferentes anticorpos descritos na tabela 2. Foram comparadas áreas que apresentavam DC no exame histopatológico com áreas de aspecto morfológico próximo da normalidade provenientes do mesmo paciente, no mesmo ato cirúrgico.

Nós utilizamos GFAP como marcador de células gliais para estudar sua presença e distribuição, e MAP2 como marcador neuronal. MAP2 é uma das principais proteínas do cito-esqueleto neuronal e tem um papel crucial na "montagem" dos microtúbulos neuronais. Essa proteína associada ao microtúbulo também tem um papel importante no brotamento, arborização e regeneração dos processos neuronais (15).

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório cerebral e nós utilizamos



ICC com anticorpos contra subunidades de receptores de glutamato incluindo receptores AMPA (GluR2/3) e receptores NMDA (NR1 e NR2A/B) para estudar a distribuição dos receptores excitatório. Estudamos também a presença de circuitos inibitórios com anticorpos anti-GABA A $\beta$  (receptores GABA) e anti-GAD. GAD é uma enzima sintetizadora de GABA localizada exclusivamente em neurônios gabaérgicos, tanto no citoplasma como em terminais.

#### Processamento do Tecido

Todo o tecido foi processado utilizando condições constantes de tempo, temperatura e mesmos reagentes para evitar variações técnicas. O tecido cerebral fresco era recebido diretamente na sala cirúrgica e vários blocos eram feitos para amostragem de todo o tecido ressecado. Os blocos eram fixados por 36-48 horas em 4% de paraformaldeído a 4°C, crioprotégidos em sucrose tamponada a 20%, e cortados em criostato com 30 $\mu$ m de espessura. As amostras de neocórtex eram então avaliadas utilizando coloração cresyl-violeta (CV) e ICC para os anticorpos listados na tabela 2. Após cortado em criostato, o tecido era colocado em placas de cultura em células individuais de 3 ml contendo 0,05M Tris solução salina (TBS, pH 7,6). O tecido livre era então processado imediatamente e lavado em TBS entre cada etapa: (1) 5 minutos em 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 10% metanol em TBS; (2) 60 minutos em soro de cabra normal a 1,5% para bloqueio; (3) 18 hora de pernoite, em movimento, em temperatura ambiente, no anticorpo primário; (4) 35 minutos em anticorpo secundário biotinizado (ABC kit, Vector lab.); (5) 0,05% 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em TBS foi utilizado para coloração da reação em pratos de Petri por 8 minutos seguido de enxágüe em TBS gelado para terminar a reação; (6) o tecido era montado em lâminas que eram então secas ao ar livre por várias horas e cobertas com lamínula.

## RESULTADOS

O perfil clínico está apresentado na Tabela 1. A idade variou de 10 meses a 6 anos (média 35,5 meses; mediana 25 meses). Todas as crianças tinham epilepsia focal, sem outros achados neurológicos significativos exceto por leve atraso no desenvolvimento em duas. Todas apresentavam áreas focais de displasia diagnosticada pela MRI. Três tinham lesões frontais e uma apresentava lesões mais difusas, envolvendo áreas temporal, parietal e occipital. Todas foram submetidas a ressecções corticais que incluíam margens além da lesão definida pela RM.

### Caracterização Morfológica do córtex displásico baseado em CV

O córtex displásico de todos os pacientes apresentavam características histopatológicas semelhantes. Ele era caracterizado por estrutura laminar cortical desorganizada com um grande número de neurônios com arborização dendrítica aberrante (Figura 1-A, B). Esses neurônios estavam presentes ao longo de todas as camadas corticais, mas eles eram especialmente freqüentes na junção da substância branca com a cinzenta e algumas vezes estavam presentes distintamente na substância branca subcortical, dando a impressão de um espessamento focal do córtex. Alguns neurônios apresentavam citoplasma vacuolado. O córtex displásico, bem como a substância branca subcortical, também mostravam células com citoplasma pálido que apresentava algumas vezes dois ou mais núcleos deslocados (células balonadas) (Figura 2-A). A transição entre áreas de displasia e áreas normais foi gradual em todos os pacientes estudados.

As figuras 1 A e B apesar de serem amostras de córtex provenientes do mesmo paciente que C e D, foram retiradas distantes do foco epiléptico registrado pelo EEG e a laminação cortical está praticamente normal ao exame morfológico, com neurônios de aparência normal, com dendritos apicais apontando para a superfície pial.



### Imuno-histoquímica

GFAP foi utilizado em 3 pacientes. Todos eles mostraram um aumento do número de células gliais, mais marcado em áreas corticais com uma concentração maior de neurônios displásicos e na substância branca subcortical. As células balonadas mostraram positividade variável ao GFAP (Figura 2B), algumas com coloração mais intensa e homogênea que outras. Entretanto, muitas dessas células foram negativas para GFAP.

MAP 2 é um marcador positivo nos dendritos e no pericário dos neurônios. Em áreas de aparência normal, os dendritos apicais coraram melhor que o corpo celular. Em áreas de displasia, a concentração de MAP2 nos dendritos estava diminuída e os neurônios displásicos apresentaram intensa coloração no corpo celular e em dendritos alargados (Figura 3-B). Ocasionalmente eram encontrados algumas células balonadas e ainda células com a aparência de astrócitos fracamente corados pelo MAP2 (Fig. 3 C,D), o que indica que pelo menos algumas dessas células podem estar predispostas a serem neurônios.

O córtex displásico, assim como o normal, apresentou neurônios positivos para o anticorpo NMDAR1, embora alguns neurônios displásicos mostrem coloração mais intensa que em áreas normais. NMDAR1 é provavelmente um componente obrigatório do receptor NMDA e tem expressão em quase todos os neurônios corticais. Em contraste com receptores não-NMDA, que também estão presentes em células gliais, esses receptores estão presentes apenas em neurônios, sendo também um bom marcador neuronal. Essa subunidade de receptor de glutamato foi positivo em células balonadas com coloração menos intensa que em neurônios displásicos e não-displásicos (Figura 2-C), sugerindo novamente que algumas dessas células podem ter função neuronal. NR2A/B, que está ausente em áreas corticais normais, foi positivo em alguns neurônios displásicos e também em células balonadas (Fig. 2-D).

Em todos os pacientes foi utilizado GluR 2/3 que esteve presente em neurônios displásicos e não displásicos. A coloração em neurônios displásicos foi sempre mais intensa quando comparada com neurônios normais. Esse anticorpo AMPA reconhece ambas subunidades, GluR2 e GluR3. Aparentemente essa subunidade foi a mais constantemente aumentada em neurônios displásicos nessa população. Também observamos células balonadas fracamente coradas com anti-GluR2/3.

Os neurônios inibitórios foram estudados com GAD que está presente no citoplasma de neurônios gabaérgicos ao longo de todas as camadas corticais e em terminais na substância cinzenta de área com morfologia normal (Figura 5 A,B). Em algumas áreas displásicas, esse anticorpo esteve principalmente concentrado em torno das células grandes localizadas na transição entre substância branca e cinzenta, onde também pudemos observar uma alta concentração de receptores GABA-A $\beta$  (Figura 5 C-F), sugerindo a presença de um circuito inibitório funcionando e aumentado nessas áreas.

## DISCUSSÃO

A melhoria dos estudos de neuroimagem tem levado ao reconhecimento de que provavelmente a lesão cortical mais comum em pacientes com epilepsia é a DC. Como os pacientes com DC são comumente refratários ao tratamento médico, o número de pacientes, especialmente crianças, submetidos à cirurgia, tem aumentado consideravelmente. Aliado a esse fato, o desenvolvimento de novas técnicas e novos anticorpos para estudar o tecido cerebral torna possível o estudo morfológico com correlações funcionais, o que melhora nosso conhecimento sobre possíveis mecanismos de epilepsia em pacientes com DC. Apenas recentemente tem crescido o interesse pelo estudo de mecanismos de DC e de epilepsia focal (13, 14, 18), mas poucos estudaram crianças com várias técnicas para testar hipóteses específicas.

Nós estudamos 4 crianças com perfil clínico e características histopatológicas similares com o objetivo de descrever a distribuição de neurônios excitatórios e



inibitórios nesses pacientes. Em áreas de displasia nós encontramos algumas características peculiares, já descritas em estudos morfológicos prévios, como a presença de citoarquitetura desorganizada com grandes neurônios displásicos, alguns com vacuolização citoplasmática, e presença de células balonadas. Esses achados provavelmente representam uma alteração precoce no desenvolvimento e são consistentes com formas severas de DC (8). No nosso estudo, os neurônios displásicos coraram intensamente para MAP2, tanto no citoplasma como em dendritos, enquanto no córtex aparentemente normal a coloração ocorreu preferencialmente nos dendritos. Os dendritos de neurônios displásicos foram usualmente espessos e intensamente corados com MAP2, mas nós observamos uma diminuição dos dendritos “normais” em áreas displásicas. Esse fato pode indicar a presença constante ou a persistência de regeneração e remodelagem de processos neuronais nesses neurônios dismórficos e a falta de desenvolvimento de conexões mais maduras na mesma área. Foi recentemente sugerido que formas precoces de MAPs são as responsáveis pela forte positividade com MAP2 (15,19). É possível que essas células estejam permanentemente formando conexões novas e aberrantes.

Os neurônios displásicos também mostraram forte reatividade para GluR2/3, que reconhece duas diferentes subunidades de receptores AMPA (GluR2 e GluR3), com diferentes propriedades funcionais. GluR2 é a subunidade que confere ao complexo receptor impermeabilidade ao cálcio. Não pudemos entretanto determinar o quão efetivo ou típico está o componente GluR2 em neurônios displásicos. Algumas dessas células também expressam, de forma intensa, receptores NMDA, tanto NR1 como NR2A/B. A expressão desses receptores parece ser regulada em função da etapa do desenvolvimento cortical (17). Têm sido demonstrado que um complexo receptor formado pela união de NR1 com NR2A/B apresenta uma corrente aumentada através do canal NMDA (17, 20). Estudos com dupla coloração indicam que a presença de ambas subunidades na mesma célula ocorre apenas em áreas displásicas (18). Dessa forma, as células displásicas podem ter um padrão imaturo de

receptores pós-sinápticos que leva a um aumento da excitabilidade.

Outra importante característica dessas áreas displásicas foi a presença de tipos celulares anormais, usualmente denominados de células balonadas, os quais apresentam um citoplasma claro e uma membrana celular mal definida. Algumas dessas células lembram astrócitos gemistocíticos. Elas não apresentam substância de Nissl e têm reatividade variável com GFAP. Já havia sido descrito (3, 5), e nós encontramos em nosso estudo, que algumas dessas células são positivas para GFAP, indicando que pelo menos algumas estão comprometidas para serem células gliais. Entretanto, a maioria dessas células são negativas para marcadores gliais e nós encontramos algumas células balonadas coradas para MAP2, NR1 e NR2A/B, que são marcadores exclusivamente neuronais. Algumas células balonadas também expressam o receptor AMPA GluR2/3, que está presente na maioria dos neurônios e foi também descrito em cultura de astrócitos (21). Nós podemos concluir que pelo menos algumas dessas células podem ter função neuronal, provavelmente neurônios excitatórios, aumentando o número de células excitatórias em áreas de displasia. Já foi descrito, utilizando técnica de dupla coloração, que a mesma célula balonada pode expressar tanto sinaptofisina como GFAP (22). Dessa forma, pode existir também alguma sobreposição funcional nessas células. Os astrócitos têm um papel fundamental na transmissão sináptica, sendo responsáveis pela manutenção de baixos níveis de neurotransmissores na fenda sináptica e fornecendo glutamina (ciclo glutamato-glutamina) para síntese de novas moléculas de glutamato e GABA (21). Nas displasias corticais nós temos um desenvolvimento anormal tanto neuronal como glial e a presença de astrócitos “imatuross” pode prejudicar essa importante função. Em segundo lugar, é possível que as células balonadas sejam a evidência que células indiferenciadas carregam um sítio antigênico da linhagem neuronal e glial que é suprimido com o amadurecimento celular durante a migração e desenvolvimento.

Outro importante achado do nosso estudo foi a rica rede inibitória que encontramos em torno de grandes células em áreas displásicas, especialmente



localizadas entre a substância branca e cinzenta (figura 5). No córtex não displásico, os neurônios GAD-positivos são distribuídos através do córtex e seus finos axônios e terminais correm através das diferentes camadas. Em áreas displásicas, os neurônios são positivos para receptores GABA-A $\beta$  e uma imunorreatividade aumentada de terminais positivos para GAD pode ser encontrado em torno dessas células. Isso sugere uma rede inibitória aumentada e funcionando para essas células. Aparentemente essas células são hiper-inervadas por neurônios gabaérgicos, fato semelhante ao já descrito em hipocampo de pacientes com epilepsia focal (23). Esse aumento pode contribuir para sincronização de potenciais de membrana de grupos de células, desencadeando uma crise epiléptica.

Concluindo, existem várias alterações morfológicas e funcionais em áreas de displasia que provavelmente contribuem para um exuberante circuito excitatório. O sistema inibitório não parece diminuído, ao contrário, tivemos a impressão que a concentração de terminais inibitórios em torno de alguns neurônios gigantes são uma tentativa de controle da excitabilidade, embora em função dessa área ser tão epiléptica, é possível que essa rede inibitória esteja contribuindo para geração de crises.

Paciente	Lado	Idade	Início crises	Sexo	Classificação	Condições Associadas	Ressonância Magnética Cerebral
1222981	E	6 anos e 10 meses	2 anos	F	Epilepsia frontal E	Nenhuma	Aumento de sinal frontal medial E
0319971	E	10 meses	7 semanas	M	Epilepsia Peri-Rolândica E	Discreto atraso de desenvolvimento; hemiparesia direita	Espessamento da substância cinzenta no lobo frontal E
1218971	D	22 meses	1 dia	M	Epilepsia têmporo-parietal D	Nenhuma	Disgenesia temporo-parieto-occipital D com espessamento de giros e sulcos anormais
0225991	E	28 meses	10 meses	F	Epilepsia Frontal E	Discreto atraso linguagem	Disgenesia cerebral com junção substância branca-cinzenta anormal no lobo frontal inferior E

Tabela 1: Dados Clínicos



**Tabela 2:** Anticorpos usados nesse estudo:

<b>Anticorpo (tipo)</b>	<b>Origem</b>	<b>Concentração</b>	<b>Especificidade</b>
GFAP (monoclonal)	Boehringer Mannheimer	2 µl/ml	Proteína ácida da fibra glial
MAP 2 (monoclonal)	Boehringer Mannheimer	0.5 µl/ml	Proteína associada ao microtúbulo 2
GluR 2/3 (policlonal)	Chemicon	4 µg/ml	Seqüência carboxil terminal de GluR 2 e GluR3
NMDAR 1 (monoclonal)	Pharmingen	2.5 µg/ml	Região transmembrana de todas as 8 variantes de NMDAR 1
NMDAR 2 A/B (policlonal)	Chemicon	5 µg/ml	C-terminal de NMDAR 2 A e B
GABA A β (monoclonal)	Boehringer Mannheimer	4 µg/ml	Cadeia β do receptor GABA A
GAD (policlonal)	National Institute of Health	0.1 µg/ml	glutamato decarboxilase

### Legenda das Figuras

**Figura 1.** Microfotografia de diferentes áreas ressecadas do lobo frontal do mesmo paciente (1222981) corado com CV. A: área distante da lesão mostrando córtex com laminação normal. B: magnificação da camada 3 mostrando neurônios com forma e tamanho normais. C: área de DC focal localizada na porção medial do lobo frontal, que também era a área mais epiléptica no registro com grade subdural. Macroscopicamente nós encontramos uma indefinição entre substância branca e cinzenta. Microscopicamente podemos ver que não existe laminação cortical e existem numerosos neurônios grandes e dismórficos ao longo do córtex. Na transição entre substância branca e cinzenta, existem células balonadas. D: magnificação de C mostrando neurônios displásicos, apontando em diferentes direções, com citoplasma grande e numerosos pequenos processos. Barra de calibração: A, B: 300 $\mu$ m. B, D: 80 $\mu$ m.

**Figura 2.** Microfotografia de células balonadas de diferentes pacientes com colorações variadas. A: substância branca do lobo frontal corada por CV. Essas células têm uma membrana mal definida, com citoplasma pálido, sem coloração para substância de Nissl. B: GFAP-ICC na junção substância branca-cinzenta do lobo temporal. C: NR1-ICC mostrando coloração citoplasmática em várias células. D: NR2 A/B-ICC também mostrando coloração no citoplasma de células balonadas. Barra de calibração A-D:40 $\mu$ m.

**Figura 3.** MAP2-ICC em diferentes áreas do lobo frontal inferior esquerdo do mesmo paciente (0225991). A: área próxima da lesão mas com córtex ainda com aparência próximo da normalidade, mostrando o padrão de coloração com MAP2 preferencialmente localizado nos dendritos apicais e também no pericário. B: área de displasia com grandes neurônios intensamente corados, tanto nos dendritos como no citoplasma. Existe uma diminuição de dendritos "normais" nessas áreas. C: na junção substância branca-cinzenta, algumas células que se parecem com astrócitos também



mostram coloração com MAP2, que é um marcador neuronal. D: profundamente na substância cinzenta, algumas células balonadas também mostram positividade mais fraca que em neurônios displásicos e não displásicos. Barra de calibração: A, C: 100 $\mu$ m; B, D: 40 $\mu$ m.

**Figura 4.** GluR2/3-ICC em diferentes áreas provenientes do lobo frontal do mesmo paciente (1222981). A: córtex de aparência normal com neurônios corados no citoplasma e dendritos; B: magnificação da camada 3 mostrando neurônios normais com dendritos apicais apontando para superfície pial. C: área de DC focal com neurônios displásicos fortemente corados para GluR2/3; D: magnificação de C mostrando neurônios grandes e displásicos com processos apontando em diferentes direções e com forte coloração para esse anticorpo. Barra de calibração: A: 200 $\mu$ m; B: 100 $\mu$ m; C,D: 80 $\mu$ m.

**Figura 5.** Microfotografia do lobo frontal. A: córtex de aparência normal corado com GAD-ICC mostrando pequenos neurônios GABAérgicos ao longo das camadas 2-4. B: padrão de coloração com GABA-A $\beta$ , localizada preferencialmente em dendritos, de uma área próxima a A. C, E: área displásica mostrando uma quantidade aumentada de imunorreatividade ao GAD em terminais em volta de grandes neurônios. E, F: mesmas áreas de C, D mostrando a presença de receptores GABA-A $\beta$  nessas células. A, B: 200 $\mu$ m; C, D: 100 $\mu$ m; E, F: 20 $\mu$ m.



FIGURA 1

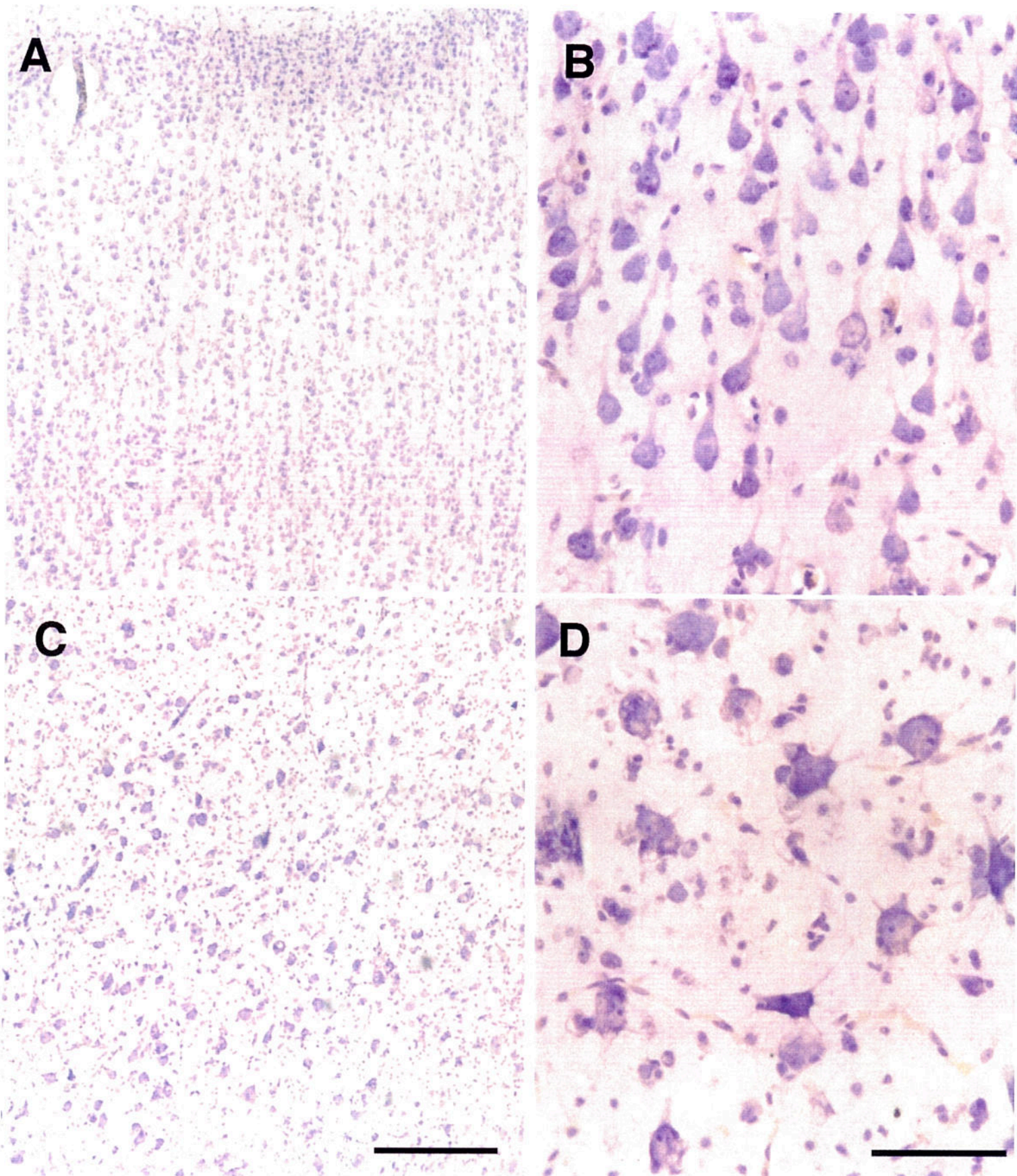




FIGURA 2

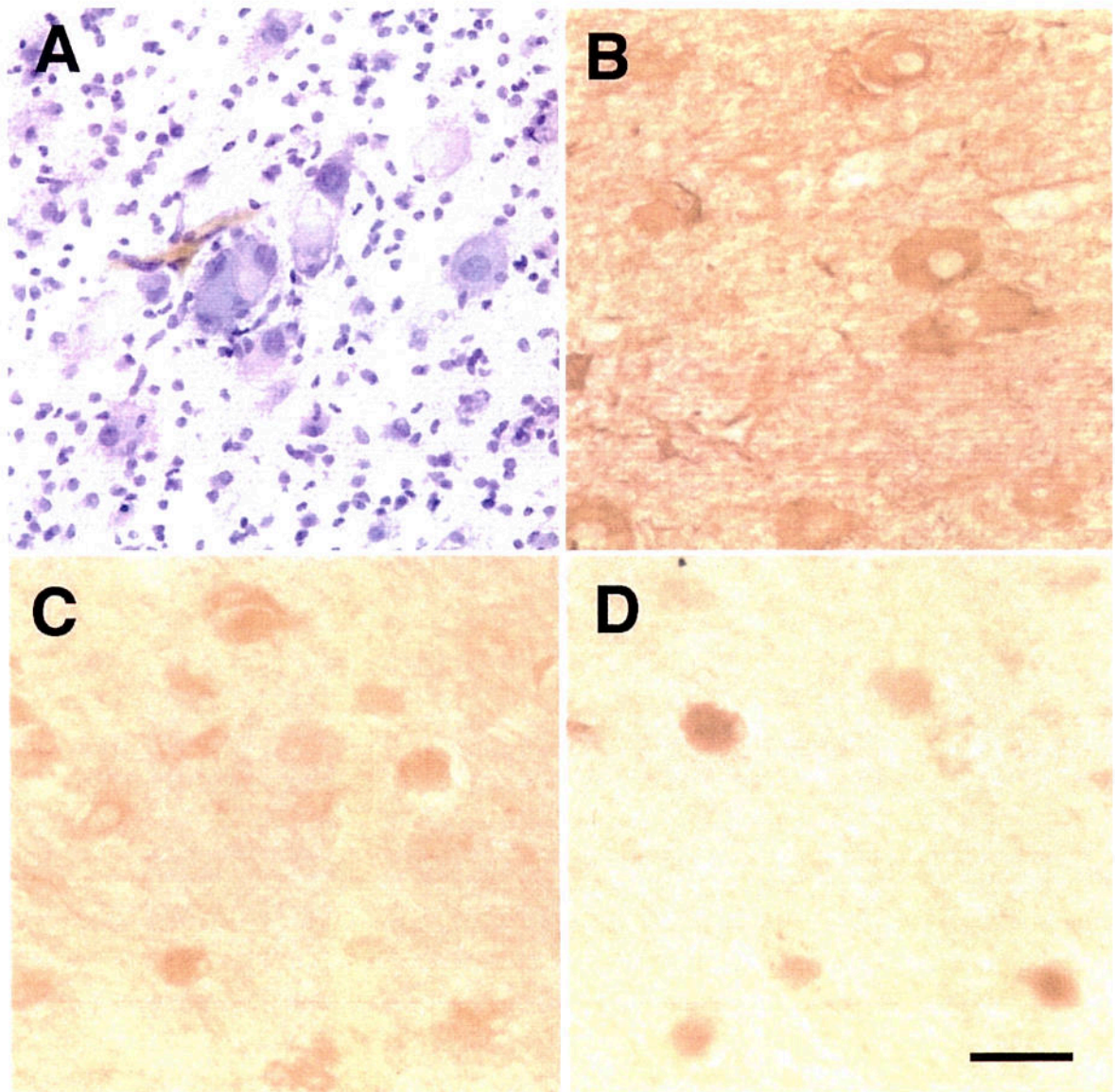


FIGURA 3

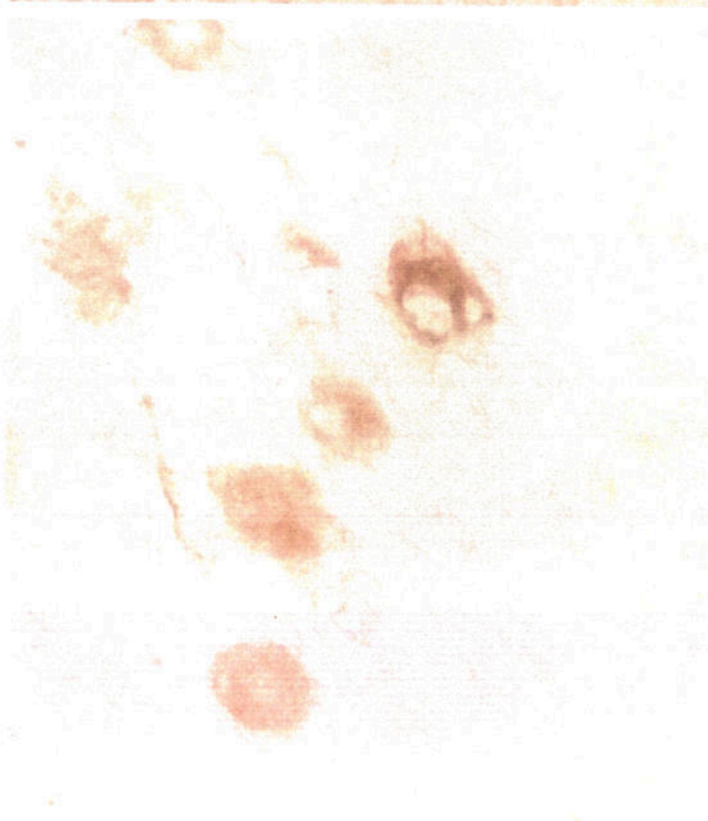
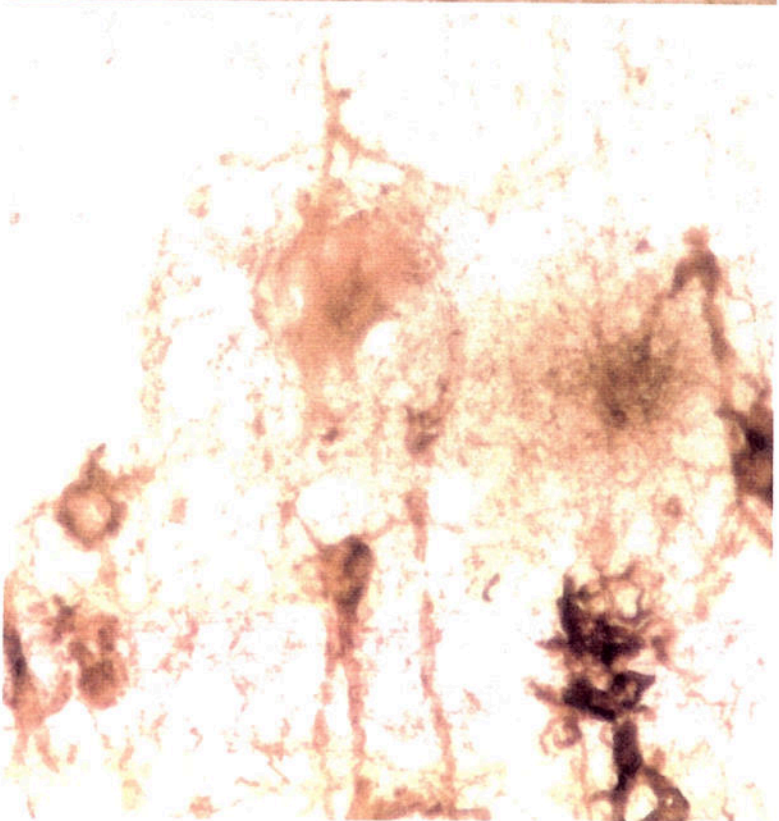
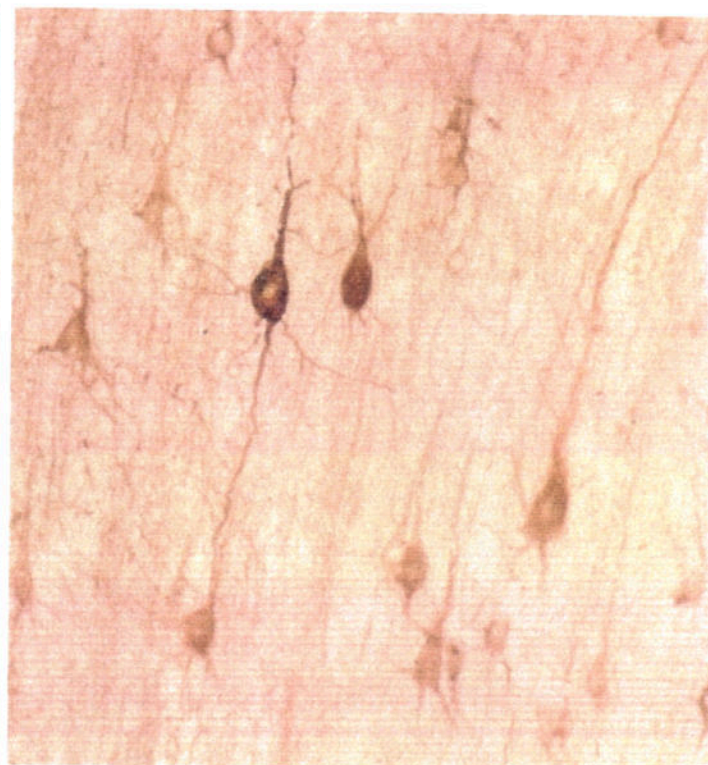




FIGURA 4

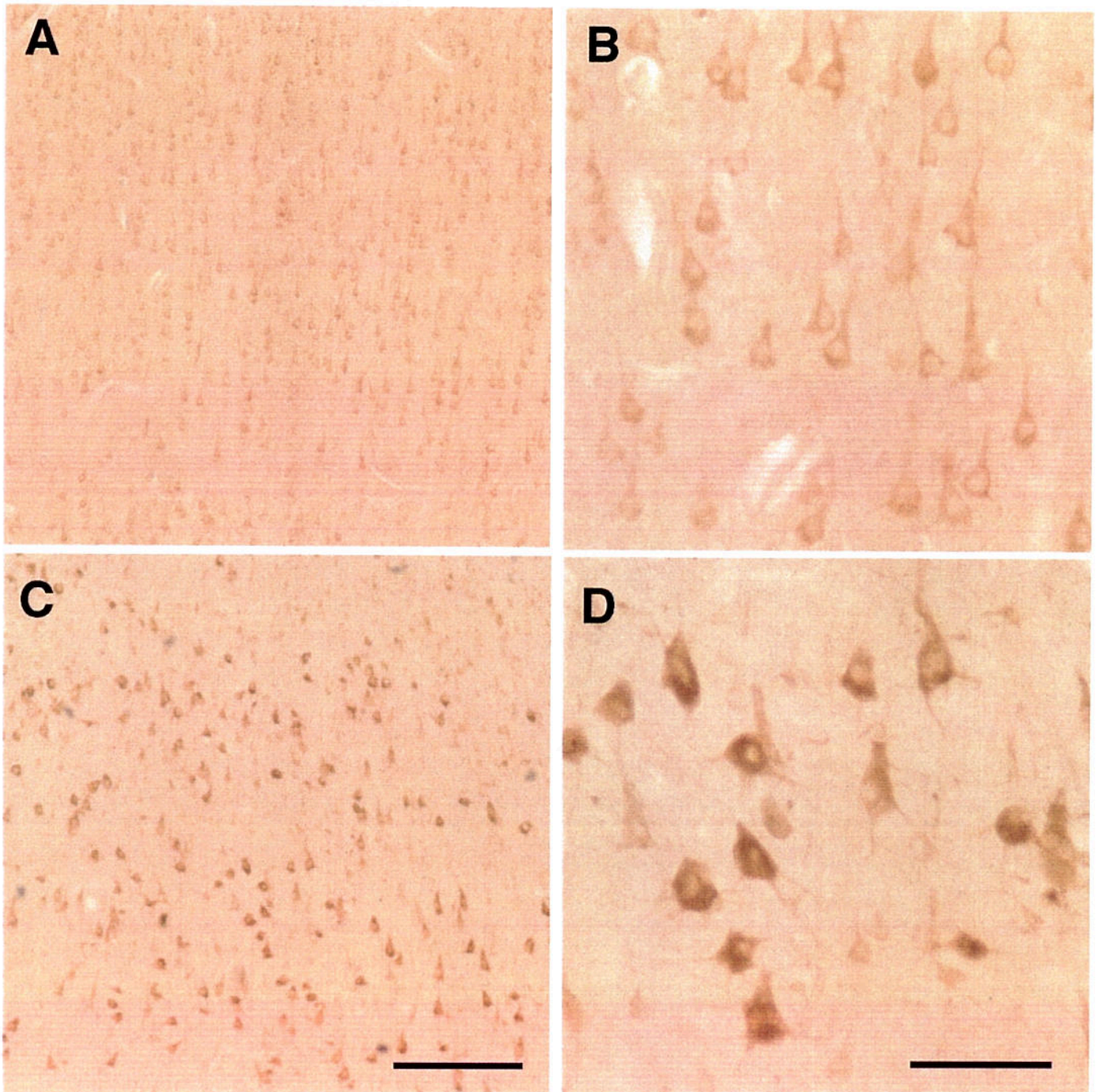
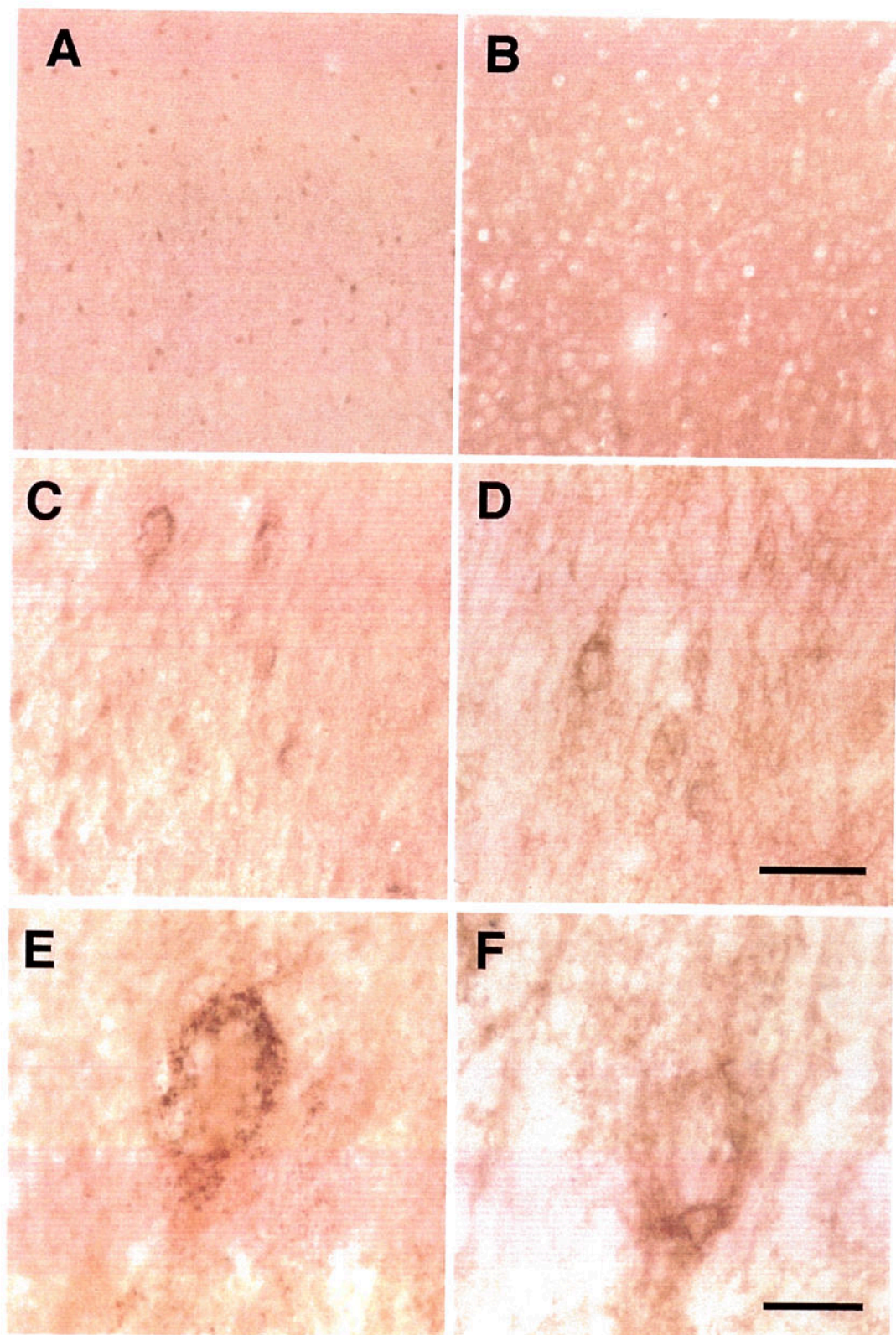




FIGURA 5





## **CORRELATION BETWEEN EXTENT OF TEMPORAL NEOCORTICAL DYSPLASIA AND HIPPOCAMPAL NEURON DENSITIES**

A. Hilbig MD; Z. Ying MD, PhD; T.L. Babb PhD; I. Najm MD; C. Wylie; and H. Lüders MD, PhD.

From the Department of Neurosciences (A. Hilbig, Z. Ying, T. Babb, and C. Wylie) and Department of Neurology (T. Babb; I. Najm and H. Lüders). The Cleveland Clinic Foundation. 9500 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44195.

Keywords: dual pathology, cortical dysplasia, glutamate receptors, hippocampal sclerosis, temporal lobe epilepsy

### **ABSTRACT**

Cortical dysplasia (CD) is now recognized as one of the major causes of focal neocortical epilepsy. The co-existence of temporal neocortical dysplasia and hippocampal sclerosis has been described with increasing frequency in patients with temporal lobe epilepsy. Despite the facts that CD may be isolated in various gyri, may be distributed in one or several layers, and may have greater densities of aberrant neurons, very little is known about the mechanisms contributing to such focal epileptogenesis. The present study documented cytologic and glutamate receptor characteristics in 23 consecutive patients to define an ordinal semi-quantitative grading scale for microscopic temporal lobe cortical dysplasia. This CD grading scale was based on concordant rating of the upregulated glutamate NMDA receptor subunit NR2 A/B which is expressed only in dysplastic neurons. Using excised temporal lobe, we correlated the grading of CD in temporal neocortex with hippocampal pyramidal neuron losses. We also compared the densities of granule cell (SG) and granule cell dispersion (GCD) in the CD group (n=23) with 12 hippocampi from patients without CD in the temporal neocortex. We tested the hypotheses that features of hippocampal sclerosis may be related to the extents of CDs and found that: 1) CD was positively correlated with the average cell loss in Ammon's horn and with greater cell losses in

CA3, CA1, and prosubiculum, 2) CD was unrelated to cell densities in CA2 and subiculum, and 3) CD was negatively correlated with both granule cell density and granule cell dispersion in the molecular layer of the fascia dentata. This CD rating scale will allow correlation with a variety of other data such as MRI, MRS, EEG patterns, clinical semiology, postoperative outcome, and suggests that some forms of hippocampal sclerosis may have etiologic factors in common with temporal lobe cortical dysplasia.

## **INTRODUCTION**

Hippocampal sclerosis is the most frequent histological finding in medically intractable temporal lobe epilepsy and has been reported as an isolated abnormality in around two thirds of patients (2, 6, 26). In the other third, various types of neocortical pathology are the major finding. However, it is well known that some of these patients have lesions in both temporal neocortex and hippocampus with an incidence that ranges from 11% (6) to 20% (13), (i.e. dual pathology). The term dual pathology usually refers to the association of hippocampal sclerosis and mass lesions in temporal neocortex (6, 4, 22, 23). Neuronal migration disorders (NMDs) or cortical dysplasia (CD) is now recognized as one of the most important pathological findings in epilepsy, but the incidence of CD in temporal neocortex and co-existing hippocampal sclerosis has not been well studied. Most studies were based on patient populations with predominantly extratemporal developmental malformations (7, 27) and usually with the diagnosis based on MRI (7, 9, 27), which is not accurate for diagnosis of microscopic CD (4, 13, 22).

The presence of cortical dysplasia occurs as a genetic or in utero consequence of multiple putative etiologic factors and results in different morphologic changes depending on which stage of development they occur (20, 28). The loss of control in the overlapping processes of proliferation, migration, terminal differentiation, programmed cell death and synaptic remodeling all may contribute to the development



of CD (5, 20). However, how focal dysplasias become epileptogenic and how these focal epileptogenic areas might further modify normal postnatal cerebral development are not understood.

Glutamate is the predominant excitatory neurotransmitter in the brain. Some studies (3, 14, 15, 29, 33) have suggested that altered glutamate receptors may lead to increased glutamate transmission in epilepsy. Recently, Ying et al., (31) reported that dysplastic neurons differentially express a glutamate receptor subunit protein (NMDAR2A/B) which is not expressed in normal human cortical neurons. The heteromeric combination of NMDAR2A/B with NMDAR1 in postsynaptic dysplastic neurons may increase NMDA channel function. Immunocytochemistry (ICC) allowed us to identify these NMDAR2 (NR2 A/B) positive neurons, and they can be estimated as a fraction of all temporal neocortex neurons. We hypothesized that increased numbers and distributions of NR2 A/B positive neurons would relate to the severity of temporal lobe cortical dysplasia. This hypothesis has been confirmed in epileptic neocortex using coimmunoprecipitation of NR1-NR2A/B (19) and dual immunofluorescence labeling of NR1 and NR2A/B in single dysplastic neurons (32). The specific aim of this study was to measure the relationships between microscopic focal cortical dysplasia in temporal neocortex and neuron losses or altered distributions of neurons in the hippocampus and dentate gyrus of patients with medically intractable temporal lobe epilepsy using a semi-quantitative analysis of NR2 A/B positive dysplastic neurons. We also compared the findings in the CD group with another group with morphologically normal temporal neocortex and neurons (i.e. no dual pathology).

## **MATERIAL AND METHODS**

We studied 35 anterior temporal lobe resections with intact temporal neocortex and hippocampus from patients with medically-intractable temporal lobe epilepsy submitted to surgery at The Cleveland Clinic Foundation Comprehensive Epilepsy Program between June 1996 and December 1998. Our sample included 23 patients with pathologic findings of cortical dysplasia in temporal neocortex (CD group) and 12

resections with only hippocampal sclerosis (non-CD group). Patients with other diagnoses such as temporal lobe tumors were excluded from the study. All patients were preoperatively evaluated with history and neurological examination, continuous scalp EEG-video monitoring, neuropsychological evaluation and the intracarotid amobarbital procedure for language and memory localization. Invasive EEG recordings with depth electrodes or subdural grids were performed when necessary. MRI studies were performed four to six weeks prior to surgery on all patients using a Siemens 1.5 Tesla Vision system. Multiple coronal T1, T2 and FLAIR images, sagittal T1 images, axial T2, and spin echo images were acquired on all patients. Clinical data and neuroimaging findings were reviewed by two of the investigators (I.N. and A.H.).

#### Hippocampal Analyses

The hippocampus was studied using sections stained for cresylecht violet (CV) for histopathologic review (30 $\mu$ m) and for quantitative measurement of cell densities (10 $\mu$ m). The pyramidal cell densities were based on morphometric techniques with Abercrombie's correction performed in different Ammon's horn subfields (CA4, CA3, CA2, CA1 and prosubiculum) and averaged to estimate the cell loss as previously described (1). The densities of granule cells in the stratum granulosum (SG) of the fascia dentata and the densities of granule cell dispersion (GCD) from the stratum granulosum were based on granule cell counting using an eyepiece grid with 10x10 boxes at a total magnification of 400X, (40x objective, 1.0x tube length, and 10x eyepiece). The most dispersed areas in the straight limbs of the upper or lower fascia dentata were counted inside the grid. We considered the stratum granulosum (SG) as all cells within the first 125 micrometers above the subgranular zone. All cells above this point, i.e. from the bottom of the inner molecular layer to the hippocampal fissure, were counted as dispersed granule cells. The estimated total density of the fascia dentata was obtained by adding the SG and GCD. The hippocampi from both the CD and the non-CD group were evaluated in the same way, and we compared the data obtained from each group.



### Temporal Neocortex Analyses and Immunocytochemistry

Neocortical samples were evaluated using cresylecht violet staining (CV) and immunocytochemistry (ICC) for glutamate receptor subunit proteins with a polyclonal antibody NMDAR2 A/B (Chemicon, Inc.) and monoclonal antibody NMDAR1 (Pharmingen, Inc.). The primary antibody NMDAR2 A/B (NR2 A/B) was raised in rabbit against a 20-amino acid synthetic peptide corresponding to the C-terminus of NMDA2A subunit that can recognize both the NR2 A and NR2 B subunits. The NR1 antibody was raised in mouse against all transmembrane region of NR1. All tissue was processed exactly in the same way, with the same times in each reagent, and with the same antibody batch, by the same scientist to avoid variance in final staining density. It must be emphasized that even longer incubation times with the primary NR2A/B antibody will not yield false stains of normal, non-dysplastic neurons. We received fresh tissue from the operating room and several blocks were made to sample the neocortical resection. The 7mm blocks were fixed for 36 hours in 4% paraformaldehyde at 4°C, cryoprotected in 20% buffered sucrose, and cryostat sections were cut at 30µm or 10µm for cell count. After cryostat sections, the tissues were placed in individual 3 ml tissue culture wells containing 0.05M Tris buffered saline (TBS, pH 7.6). Free-floating sections were processed immediately and washed in TBS between each step: (1) 5 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10% methanol in TBS; (2) 60 min in 1,5% normal goat serum for blocking; (3) 18 hr. overnight shaking at room temperature in the primary antibody (NR2 A/B: 1:200) (4) 35 min in diluted biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (ABC kit, Vector labs.); (5) 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS stained the reactive complex in Petri dishes for 8 min, rinsed with cold TBS to terminate the reaction; (6) tissue sections were mounted on chromium alum gelatin coated slides, air-dried for several hours and coverslipped. Control experiments for ICC were performed by omission of primary antibodies using the same staining protocol as mentioned above: no specific staining were seen in the absence of primary antibodies.

### Temporal Neocortical Dysplasia Characterization

All temporal neocortex considered as nondysplastic came from patients diagnosed with hippocampal epilepsy and having no evidence of temporal cortex seizures. The temporal cortex had to be resected to visualize the hippocampus for its resection. This control comparison temporal lobe was characterized in CV stains by well-preserved vertical and horizontal laminations with six distinct layers (Fig. 1-A). Layer 1 or the molecular layer was virtually neuron free. Layers 2 and 4 had small neurons densely packed, while in layers 3, 5 and 6 larger neurons were found. The normal neurons had homogeneous staining with CV, and their apical dendrites were pointing to the pial surface (Fig 1-E). Based on CV staining, dysplastic temporal neocortex was characterized according to the following criteria: lack of laminar organization, presence of clusters of disorganized neurons characterized as being misshapen, many being larger than normal neurons with both cell body and processes darkly stained for Nissl substance. These dysplastic neurons had many well-stained apical and basilar dendrites without unipolar orientation toward the pial surface (Fig.1-C,G). These findings were occasionally limited to a few layers but more often widespread to areas in all cortical layers. We frequently found heterotopic neurons in the white matter underlying dysplastic cortex, but single or multiple clusters of "normal" appearing neurons in the white matter were not considered as criteria for focal cortical dysplasia. There were no macroscopic gross abnormalities in our samples.

### Semi-quantitative analysis of NR2 A/B Immunostaining

The numbers of NR2 A/B positive neurons were variable in dysplastic areas, and we estimated them by an ordinal scale semi-quantitative analysis. Each section (average 4, 30  $\mu\text{m}$  each) of temporal neocortex was analyzed by two independent observers (A.H. and Y.Z.) who were well-trained in NR2 A/B-ICC analyses. Three reliable criteria were established: 1) the distribution of immunoreactive neurons in the sample, (% of cortex with NR2 A/B positive neurons); 2) the number of cortical layers that had NR2 A/B positive dysplastic neurons; and 3) the intensity or darkness of the



NR2 A/B staining. We gave points to each criterion as follows: (A) NR2 A/B distribution: 0.5= less than 10%; 1.0 = between 10 and 30%; 2.0 = between 30 and 70%; 3.0 = more than 70% of the sample; (B) Number of layers with NR2 A/B positive dysplastic neurons: 1.0 = one or two layers; 2.0 = more than two layers; (C) NR2 A/B staining darkness: 1.0 = faintly stained; 2.0 = moderately stained; and 3.0 = darkly stained (figure 2). We accumulated these three criteria into a single criterion called an NR2 A/B total score that ranged between 2.5 and 8.0. Based on the NR2 A/B total score and each criterion used to obtain it, we compared the grading of NR2 A/B staining with the cell losses in different subfields of Ammon's horn, with the cell densities in stratum granulosum, and with dispersed granule cells densities. Hence, a variety of correlations were made between the four interval ratings of CD and the equal interval cell counts in the hippocampus and fascia dentata.

## RESULTS

The clinical, demographic and imaging profile of both CD and non-CD group are summarized in Table 1. The age at surgery, seizure onset, and risk factors were similar in both groups. The epileptogenic focus was localized to the temporal lobe in all patients by non-invasive or invasive diagnostic procedures. MRI studies accurately identified ipsilateral hippocampal sclerosis (CD=67%, non-CD=83%) and showed bilateral hippocampal atrophy only in the CD group (9%). The presence of cortical dysplasia in the temporal neocortex was suggested in 11 patients from the CD group (11%), mainly by the loss of definition between gray and white matter.

### Immunocytochemical characterization

The temporal neocortex from patients without CD (non-CD group) did not stain normal neurons with NR2 A/B (Fig.1-B, F). By contrast, all specimens in the CD group had variable amounts of dysplastic neurons stained with NR2 A/B-ICC in dysplastic areas, with the entire neuron and its processes stained (Fig. 1-D, H). Based on the functional implication that may be involved in this finding, our semi-quantitative analysis criteria considered the most important features to estimate the upregulation of NR2

A/B: i.e. the amount of NR2 A/B staining at the cellular level (NR2 A/B darkness) and the distributions of NR2 A/B neurons (percent and number of layers) in the temporal neocortex. The distribution of NR2 A/B reaction was variable, sometimes only a small area of dysplastic neurons, and in other cases almost all cortex showing NR2 A/B immunoreaction. There usually was a predominant intensity of stain that varied from lightly to darkly stained dysplastic neurons (Fig. 2-A, B, C, D). Using various ordinal scales, we compared our NR2 A/B ratings with the cell count data from hippocampi analyzed in the same patients. We also analyzed the difference in the granule cell densities between CD and non-CD groups.

#### Hippocampal Findings and Comparison with Rating of CD

All patients had some degree of cell loss in the hippocampus. The average cell loss in Ammon's horn ranged between 26% and 78% for all patients from the CD group (n=23) and between 38% and 80% from the non-CD group (n=12) without significant differences between the two groups in any hippocampal subfield. Using a linear regression analysis we found that the degree of NR2 A/B-IR (NR2 A/B total score) in the CD group was positively correlated with the average cell loss in Ammon's horn or the degree of hippocampal sclerosis. The higher the NR2 A/B total score, the higher the cell loss in hippocampus ( $p=0.038$ ) (Figure 4). The number of cortical layers ( $p=0.0014$ ) and the percent of NR2 A/B positive neurons ( $p=0.024$ ) were better correlated with hippocampal cell loss than was the CD staining darkness ( $p=0.5=NS$ ). Analyses of each hippocampal subfield showed that the NR2 A/B total score was more related to the cell loss in the following subfields: CA1 ( $p=0.0005$ ), CA3 (0.01), and prosubiculum ( $p=0.07$ ), with a pattern very similar to hippocampal sclerosis alone. There was no correlation between the NR2 A/B grading and any of the demographic characteristics in the CD group.

A finding commonly observed in the hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy is a dispersion of granule cells in the dentate gyrus (1, 11), with various numbers of the granule cell somata into the molecular layer (Figs. 3 A, B). This



finding has been suggested to be a form of neuronal migration disorder (11). We compared both the densities of granule cells in the stratum granulosum (SG) and the amount of GCD with the severity of temporal lobe CD measured by NR2 A/B total score. There were negative correlations between NR2 A/B-IR and granule cell densities in SG ( $p=0.038$ ) and between NR2 A/B-IR and GCD ( $p=0.047$ ) (Fig. 5). We also compared the granule cell densities of SG and GCD between the two groups (CD and non-CD). In the CD group, the mean value of the SG density was 4.0 cells/mm<sup>2</sup> and differed significantly from the SG density in the non-CD group, which was 2.63 cells/mm<sup>2</sup> ( $p=0.029$ ). In the CD group, the mean value of GCD was 1.37 cells/mm<sup>2</sup>; while in the non-CD group (i.e. patients with isolated hippocampal sclerosis), the GCD was 0.94 cells/mm<sup>2</sup> ( $p=0.57$ ) (Fig. 6).

## DISCUSSION

Structural alterations of the neocortex represent a frequent morphologic finding in focal neocortical drug-refractory seizures (9, 26, 30). Cortical dysplasia represents a spectrum of neuropathologic changes due to derangement of the normal process of neocortical development that can occur at various gestational stages (20). Focal cortical dysplasia has been the object of extensive neuropathological studies, and several classifications were proposed based on morphologic or putative etiologic factors (20, 25). A range of subtle microscopic features has been described in surgical specimens including cortical laminar disorganization, marked clustering of neurons throughout cortical layers, increased numbers of molecular layer neurons, and single heterotopic neurons in the white matter (12). However, the pathological significance that can be attributed to these findings remains controversial. Neuronal migration disorders per se do not lead to seizures, and the major questions to be answered are which features of these structural disorganizations are associated with functional hyperexcitability. One possible explanation may be that dysplastic neurons vary in their intrinsic physiologic properties, which originate primarily from the cell's membrane and

its ion channels (8, 24). A modification in channel composition may lead to hyperexcitability by increasing the response to excitatory transmitters.

Glutamate is the major excitatory transmitter in the brain. The two most important ionotropic receptors are the AMPA receptors, which are responsible for fast depolarizations through opening sodium and potassium channels, and the NMDA receptors, which mediate prolonged neuronal depolarization (10, 24) and are considered necessary for seizures. To date, two subfamilies of NMDA receptors have been identified: NMDAR1 (NR1) and NMDAR2 (NR2). NR2 has four separate subunits (A-D) encoded by different genes while NR1 has eight splicing variants (A-H); (10, 24). Homomeric channels formed from the expression of NMDAR1 are fully functional, but the glutamate-induced currents observed in these channels are quite small. NMDAR2 does not form functional ion channels to glutamate; however, when NR2 subunit receptors coassemble with NR1 receptors, functional channels are observed with much larger conductances in response to either glutamate or NMDA (8, 10, 24). We found NR2 A/B positive neurons only in temporal neocortex with some degree of morphologic alteration, implying that these glutamate receptors are not expressed in "normal" temporal neocortex. It was already described that dysplastic neurons express the glutamate receptor subunit protein NR2 A/B which is not seen in non-dysplastic cortex, and they also express NR1 (31). Using laser confocal imaging of double-labeled NR1-NR2 A/B immunofluorescence, dysplastic single neurons were positively labeled with both NR1 and NR2 A/B (32). Also, we found that in resected CD epileptic cortex, compared to remote non-epileptic cortex, there was NR1-NR2 co-immunoprecipitation (19). Thus, the hyperexcitability in areas of CD may be caused and/or enhanced by the heteromeric coassembly of NR1 and NR2A/B subunits. We recently described that NR2A/B subunit expression is strongly correlated with in situ epileptogenicity as recorded by subdural electrode arrays (21). Since NR2 A/B expression occurs only in dysplastic neurons, it may be a "functional" indicator of microscopic focal cortical



dysplasia, and the presence of these NR1-NR2 receptors may be a predictor of a neuronal population with "functional" hyperexcitability.

Hippocampal sclerosis (HS) and its widespread axo-dendritic synaptic reorganization are well-studied conditions always associated with focal hippocampal epilepsy (12, 16). In HS, the distribution of neuronal loss, gliosis, and neosynaptogenesis in the hippocampus is relatively stereotyped with the greatest damage occurring in areas of CA1, CA3, CA4 and fascia dentata, while the CA2 subfield often remains less damaged. There is no significant cell loss in the subicular complex. However, there are relevant questions to be answered about the pathogenesis of hippocampal sclerosis. We do not know if a specific brain injury or a developmental disease such as CD can predispose to HS. Perhaps the most interesting result in this study was that we found a positive correlation between CD and HS, with a pattern similar to the cell loss of HS alone. These findings suggest that HS and some forms of CD may have a common etiologic factor such as a genetic predisposition. Another possibility is that the upregulation of NR2 A/B might be a secondary consequence of epilepsy. The facts against this "epilepsy-driven" hypothesis are: 1) we did not find correlations between the age of onset or duration of epilepsy and the numbers of NR2 A/B positive neurons in the CD group, and 2) we did not find NR2 A/B-IR in temporal neocortex from the non-CD group, although all those patients had long histories of seizures. However, our study cannot definitively exclude the possibility that hippocampal seizures propagating to the nearby temporal neocortex may contribute to receptor upregulations in some cases. However, the evidence is stronger for the first hypothesis of dual pathology of HS and CD, which may result in dual epileptogenicity.

Another interesting finding has been related to granule cell dispersion. The hypothesis that the different organization of the dentate gyrus, especially the granule cell dispersion, may represent a form of neuronal migration disorder similar to temporal lobe CD was not supported. We expected to find a positive correlation between GCD

and the degrees of temporal neocortical dysplasia. However, the correlation was negative. There was a significant difference between the granule cell densities in SG alone, but we could not find significant differences in the densities of the GCD between the CD and non-CD groups. It is possible that the severe granule cell loss in HS confounded the GCD because there were fewer granule cells (SG) to be dispersed, which could account for a negative correlation between the extent of CD and GCD. In conclusion, we have shown that temporal neocortex with microscopic cortical dysplasia also expresses different degrees of upregulation of the NMDAR2 receptor subunit, and these findings are significantly correlated with increased cell loss in the hippocampus. This suggests a form of dual pathology, i.e. typical HS which is definitely epileptogenic, and temporal cortical dysplasia of varying degrees that may be hyperexcitable. However, for typical HS resections even the most severe CD observed were milder than the typical "single" CD cases referred for cortical resection alone. Hence, it is likely that these temporal lobe CDs represent etiologic abnormalities of genetic or in utero causes that have some coincidence with mechanisms leading to the stereotypic cell death in HS. It is important to mention that in human HS NR2A/B receptors are increased in the epileptic molecular layer (17), and both NR1-NR2 coassembly is increased in the intrahippocampal kainate epileptic rat (18).

### **Acknowledgments**

The authors thank the Comprehensive Epilepsy Surgery Program and the Clinical Neurophysiology lab for the precise preoperative diagnoses made on the patients reported in this paper. The research on resected human brain was approved by the Institutional Review Board (Approval number IRB 1263). Supported by NIH grants 31655 (T.B.) and 31850 (T.B.) and the CNPq (Brazil) (A. H.).



## REFERENCES

1. Babb, T. L., W.J. Brown, J. Pretorius, C. Davenport, J. P. Lieb, P. Crandall. 1984. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 25:729-740.
2. Babb T.L., & W.J. Brown. 1987. Pathological findings in epilepsy. In: *Surgical treatment of epilepsy* (J. Engel Jr ed.), pp. 511-540. Raven Press, New York.
3. Babb, T. L., G.W. Mathern, J, P. Leite, J. K. Pretorius, K.M. Yeoman, P. A. Kuhlman. 1996. Glutamate AMPA receptors in the fascia dentata of human and kainate rat hippocampal epilepsy. *Epilepsy Research*. 26:193-205.
4. Babb, T. L. 1997. Hippocampal sclerosis and dual pathology: experimental and clinical evidence for developmental lesions. In: *Pediatric Epilepsy Syndromes and their Surgical Treatment* (I. Tuxhorn, H. Holthausen, H. Boenigk, eds), pp. 227-233. John Libbey & Company, London.
5. Barth, P. G. 1987. Disorders of Neuronal Migration. *The Canadian Journal Of Neurological Sciences*.14: 1-16.
6. Bruton, C. J., J. R. Steves, C. D. Frith. 1994. Epilepsy, psychosis and schizophrenia: clinical and neuropathological correlations. *Neurology*. 44:34-42.
7. Cendes, F., M. J. Cook, C. Watson, F. Andermann, D. R. Fish, S. D. Shorvon, P. Bergin, S. Free, F. Dubeau, D. L. Arnold. 1995. Frequency and characteristics of dual pathology in patients with lesional epilepsy. *Neurology*. 45: 2058-2064.
8. Dichter MA , Wilcox KS. 1997. Excitatory Synaptic Transmission. In: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook* (Engel J and Pedley TA., eds), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
9. Ho, SS, R.I. Kuzniecky, F. Giliam, E. Faught, R. Morawetz. 1998. Temporal lobe developmental malformation and epilepsy. Dual pathology and bilateral hippocampal abnormalities. *Neurology* 50:748-54.
10. Hollmann, M , S. Heinemann. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci*. 17:31-108.

11. Houser, C. R. 1992. Morphological changes in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res. Suppl.* 7: 223-234.
12. Kasper, B. S., H. Stefan, M. Buchfelder, W. Paulus. 1999. Temporal lobe microdysgenesis in epilepsy versus control brains. *J. Neuropath. Experimental Neurology.* 58:22-28.
13. Levesque, M. F., N. Nakasato, H. V. Vinters, T. L. Babb. 1991. Surgical treatment of limbic epilepsy associated with extrahippocampal lesions: the problem of dual pathology. *J Neurosurg.* 75: 364-370.
14. Lynd-Balta, E, W. H. Pilcher, S. A. Joseph. 1996. Distribution of AMPA receptor subunits in the hippocampal formation of temporal lobe epilepsy patients. *Neuroscience* 72:15-29.
15. Mathern, G. W., J. P. Leite, T. L. Babb, J. K. Pretorius, P. A. Kuhlman, D. Mendoza, I. Fried, A. C. Sakamoto, J. A. Assirati, P. D. Adelson, W. J. Peacock. 1996. Aberrant hippocampal mossy fiber sprouting correlates with greater NMDAR2 receptor staining. *Neuroreport* 7:1029-35.
16. Mathern, G. W., P. A. Kuhlman, D. Mendoza, J. Pretorius. 1997. Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. *J. Neuropath. Exp. Neurology.* 56: 199-212.
17. Mathern, G. W., J. K. Pretorius, J. P. Leite, H. I. Kornblum, D. Mendoza, A. Lozada, E. H. Bertram. 1998. Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res.* 32: 154-71.
18. Mikuni, N, T. L. Babb, C. Wyllie. 1999. Increased NR1-NR2 A/B coassembly as a mechanism for rat chronic hippocampal epilepsy. *Neurosci. Letters.* 267: 165-168.
19. Mikuni, N., T. L. Babb, Z. Ying, I. Najm, K. Nishiyama, C. Wyllie, K. Yacubova, and T. Okamoto. 1999. NMDA receptor 1 and 2A/B coassembly increased in human epileptic focal cortical dysplasia. *Epilepsia.* In Press.



20. Mischel, P. S., L. P. Nguyen, H. V. Vinters. 1995. Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy. Review of Neuropathologic Features and Proposal for a Grading System. *J. Neuropath. Exp. Neurology*. 54:137-53.
21. Najm, I, Z. Ying, T.L. Babb, A. Mohamed, E. LaPresto, E. Wyllie, P. Kotagal, W. Bingaman, N. Foldvary, H. Morris, H.O. Luders. 1998. NMDA receptors 2 A/B subtype differential expression in human cortical dysplasia. Correlation with in situ epileptogenicity. *Epilepsia*. 39:24.
22. Nakasato, N, M. F. Levesque, T. L. Babb. 1992. Seizures outcome following standard temporal lobectomy: correlation with hippocampal neuron loss and extrahippocampal pathology. *J. Neurosurgery*. 77:194-200.
23. O'Brien, T. J. , C. Kilpatrick, V. Murrie, S . Vogrin, K. Morris, M. J. Cook. 1996. Temporal lobe epilepsy caused by mesial temporal sclerosis and temporal neocortical lesions. A clinical and electroencephalographic study of 46 pathologically proven cases. *Brain*. 119: 2133-2141.
24. Ozawa, S., H. Kamiya, K . Tsuzuki. 1998. Glutamate Receptors in the Mammalian Central Nervous System. *Progress in Neurobiology*. 54: 581-618.
25. Palmini, A., F. Andermann, A. Olivier. D. Tampieri, Y. Robitaille, E. Andermann, G. Wright. 1991. Focal neuronal migration disorders and intractable partial epilepsy: a study of 30 patients. *Ann. Neurology*. 30: 741-49.
26. Prayson, R. A., M. L. Estes. 1995. Cortical dysplasia: A histopathologic study of 52 cases of partial lobectomy in patients with epilepsy. *Hum. Pathol*. 26: 493-500.
27. Raymond, A. A., D. R. Fish, J. M. Stevens, M. J. Cook, S. M. Sisodaya, S. D. Shorvon. 1994. Association of hippocampal sclerosis with cortical dysgenesis in patients with epilepsy. *Neurology*. 44: 1841-1845.
28. Sarnat, H. B. 1993. Cerebral cortical development: normal and pathologic process. In: *The treatment of epilepsy: principle and practice* (E. Wyllie, ed.) Lea & Febiger, Philadelphia.

29. Spreafico, R., G. Battaglia, P. Arcelli, F. Andermann, F. Dubeau, A. Palmini, A. Olivier, J. G. Villemure, D. Tampieri, G. Avanzini, M. Avoli. 1998. Cortical dysplasia: an immunocytochemical study of three patients. *Neurology*.50: 27-36.
30. Wyllie, E., C. Baumgartner, R. Prayson, M. Estes; Y. Comair, J. Kosalko, C. Skibinski. 1994. The clinical spectrum of focal cortical dysplasia and epilepsy. *J. Epilepsy*. 7: 303-312.
31. Ying, Z, T. L. Babb, Y. G. Comair, W. Bingaman, M. Bushey, K. Touhalisky. 1998. Induced expression of NMDAR2 proteins and differential expression of NMDAR1 splice variants in dysplastic neurons of human epileptic neocortex. *J. Neuropath. Exp. Neurology* 51: 47-62.
32. Ying, Z., T. L. Babb, N. Mikuni, I. Najm, J. Drazba, W. Bingaman. 1999. Selective co-expression of NMDAR2A/B and NMDAR1 subunit proteins in dysplastic neurons of human epileptic cortex. *Exp. Neurology*. In Press.
33. Ying, Z., T. L. Babb, Y. G. Comair, M. Bushey, K. Touhalisky. 1998. Increased densities of AMPA GluR1 subunit proteins and presynaptic mossy fiber sprouting in the fascia dentata of human hippocampal epilepsy. *Brain Res*. 798: 239-246.



Table 1: Patients demographics, clinical and imaging characteristics. Two preoperative MRI studies not available for review in CD group.

	<b>CD group</b> (n=23)	<b>Non-CD group</b> (n=12)
<b>Age at surgery</b> (mean $\pm$ SD) median	27.3 ( $\pm$ 10.8) 26	26.3 ( $\pm$ 10.9) 30
<b>Seizure onset</b> (mean $\pm$ SD) median	11.2 ( $\pm$ 11.5) 8	10.6 ( $\pm$ 7.2) 12.5
<b>Seizure Semiology</b> Aura Automotor sz. GTC sz.	15/23 (65%) 19/23 (83%) 16/23 (69%)	9/12 (75%) 11/12 (92%) 3/12 (25%)
<b>Side of surgery</b> Left Right	13/23 (56%) 10/23 (44%)	4/12 (33%) 8/12 (66%)
<b>Risk factors</b> Febrile seizure Infection Head trauma	10/23 (43%) 4/23 (17%) 5/23 (22%) 1/23 (4%)	6/12 (50%) 4/12 (33%) 1/12 (8%) 1/12 (8%)
<b>MRI characteristics</b> HC Atrophy ipsilateral bilateral  HC FLAIR signal increased ipsilateral bilateral  Extrahippocampal abnormalities	16/21 (76%) 14/21 (67%) 2/21 (9%)  16/21 (76%) 11/21 (52%) 5/21 (24%)  11/21 (52%)	10/12 (83%) 10/12 (83%) 0/12  7/12 (58%) 4/12 (33%) 3/12 (25%)  0/12

## LEGENDS

**Figure 1.** A, E: Photomicrographs from posterior temporal lobe stained with CV showing normal cytoarchitecture of these regions. In A we can differentiate the 6 layers plus white matter (WM), and in E the normal shapes of neurons from layer 3 are shown. B: the same region of adjacent cortex stained for NR2 A/B-ICC shows no neuronal staining, and F shows high magnification NR2A/B stain 30  $\mu\text{m}$  adjacent to panel E. C, G: area of cortical dysplasia in posterior temporal lobe from another patient showing no laminar organization, some neurons larger than normal ones and all neurons darkly stained for Nissl substance. G: magnification from layer 2/3 with misshapen neurons pointing in different directions. D: NR2 A/B staining showing clusters of positive neurons in layer 2 and neuronal staining throughout the cortex. H: higher magnification of NR2A/B staining 30  $\mu\text{m}$  adjacent to G to show somata and dendritic receptors. Calibration bar: A, B, C, D: 200 $\mu\text{m}$ ; E, F, G, H: 40 $\mu\text{m}$ .

**Figure 2.** Photomicrographs of temporal neocortex from patients with different grades using our NR2 A/B-ICC ordinal semi-quantitative analysis. A: Normal cortex with no neurons stained with NR2 A/B; B: dysplastic cortex with neurons faintly stained with NR2 A/B; C: dysplastic neurons moderately stained with NR2 A/B; D: dysplastic neurons darkly stained with NR2 A/B. Calibration bar: 60 $\mu\text{m}$

**Figure 3.** Photomicrographs of fascia dentata (cresylecht violet stains) from different patients. A: well-defined stratum granulosum (SG), but a significantly decreased granule cell density; B: Note the granule cells dispersed into the inner molecular layer (termed granule cell dispersion: GCD). H=hilus. Calibration bar:100 $\mu\text{m}$ .

**Figure 4.** Correlation between CD severity measured by NR2 A/B ICC staining and the average cell loss (%) in the Ammon's horn. The higher the NR2 A/B total score, the higher the cell loss in hippocampal pyramidal neurons ( $p=0.038$ ).

**Figure 5.** Correlation between CD severity measured by NR2 A/B-ICC staining and cell densities in dentate gyrus (cells/ $\text{mm}^2$ ) measured by CV-staining. No measure of CD indicator (NR2 A/B total score, NR2 A/B darkness or NR2 A/B distribution) was



positively related to GCD or SG cell density. Rather, they were negatively correlated. The solid line and the black triangles show a significantly negative correlation between NR2 A/B total score and GCD ( $p=0.047$ ). The dashed line and open circles also show a negative correlation between NR2 A/B total score and cell density in SG ( $p=0.036$ ).

**Figure 6.** Cell densities (cells/mm<sup>2</sup>) in the dentate gyrus either from CD or non-CD groups. The mean value of the SG cell density differed significantly between CD and non-CD groups ( $p=0.029$ ). The cell density of GCD was not significantly different between the two groups ( $p=0.57$ ). In the CD group, the difference between SG and GCD ( $p<0.0001$ ) was greater than in the non-CD group ( $p=0.0007$ ).

FIGURE 1

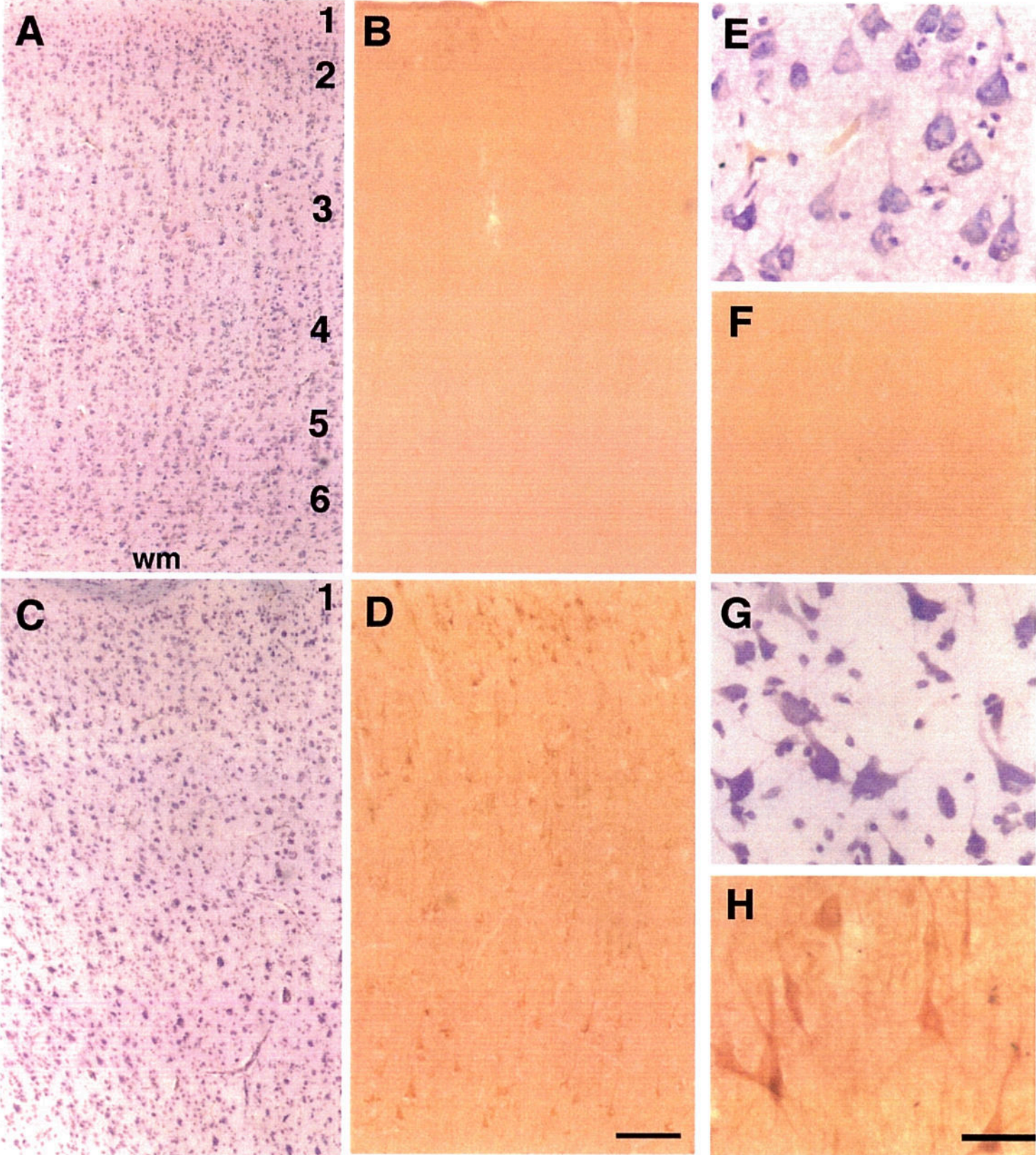




FIGURE 2

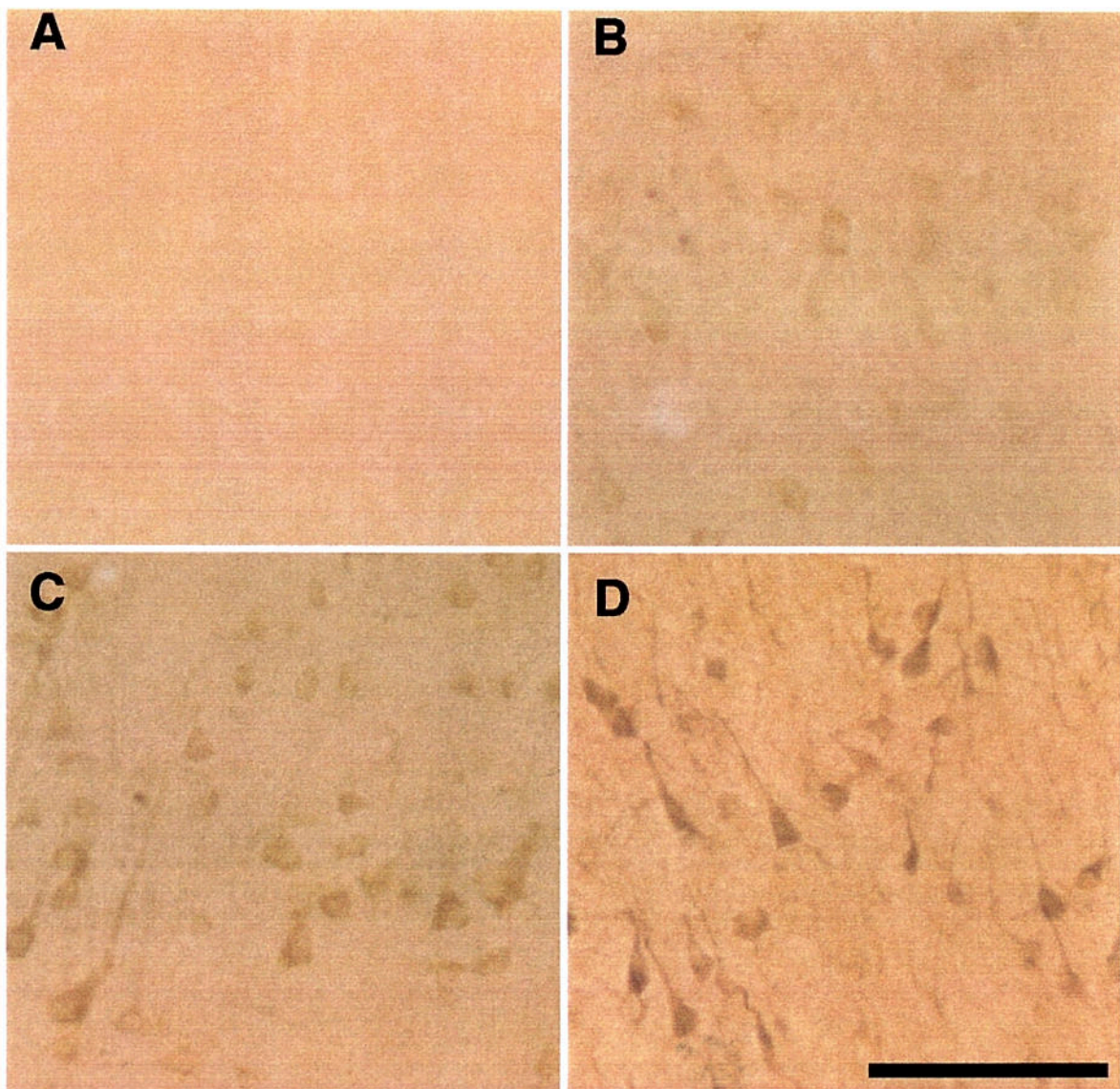


FIGURE 3

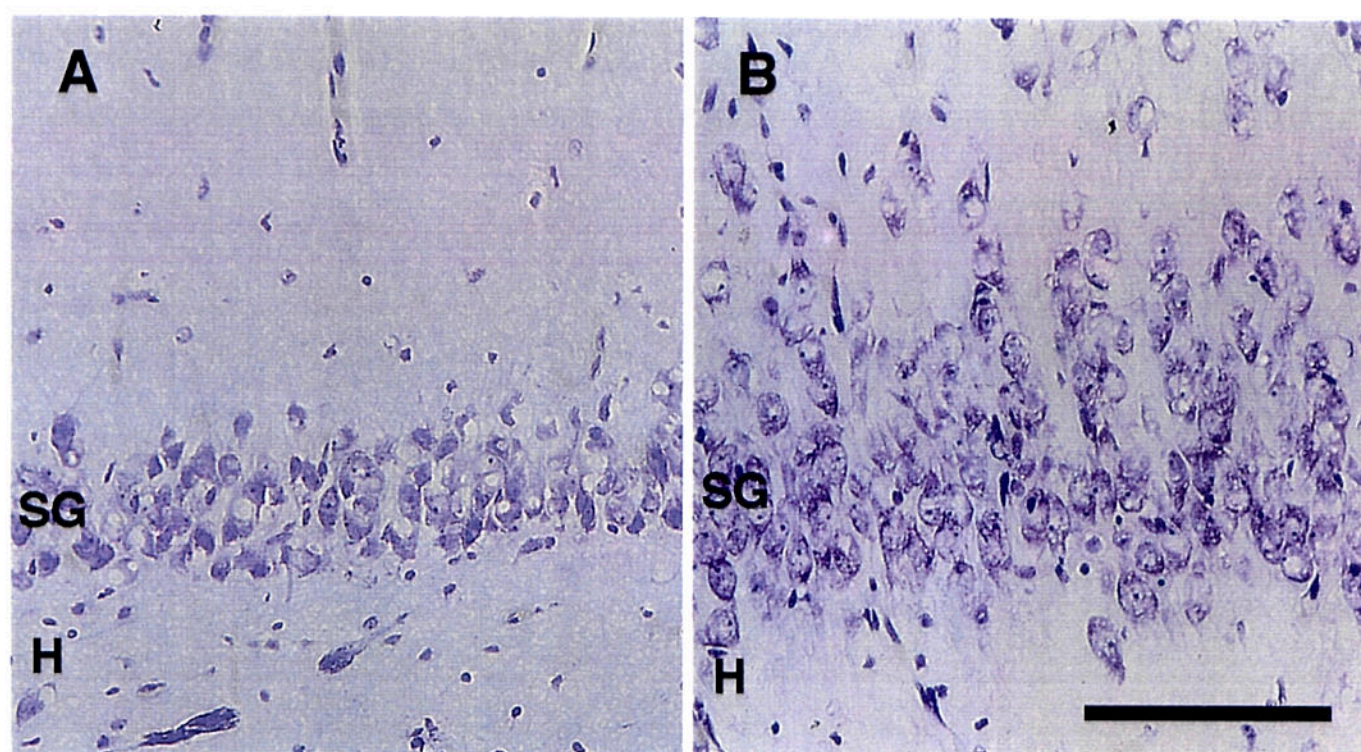




Figure 4

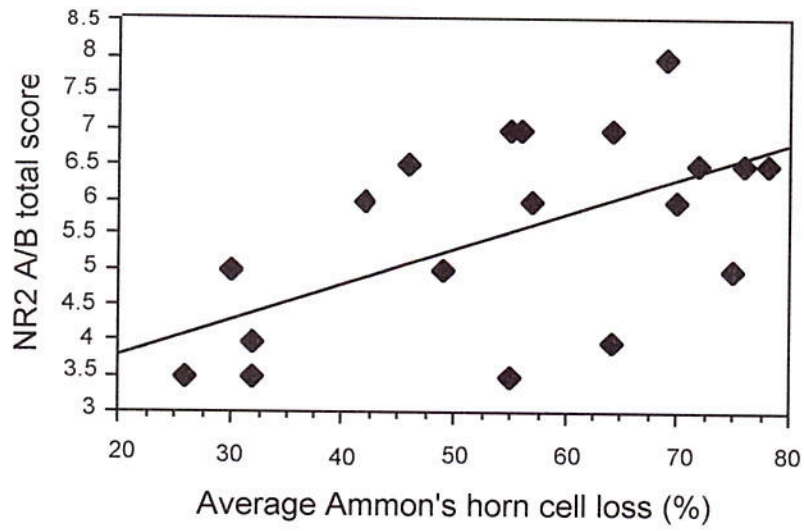


Figure 5

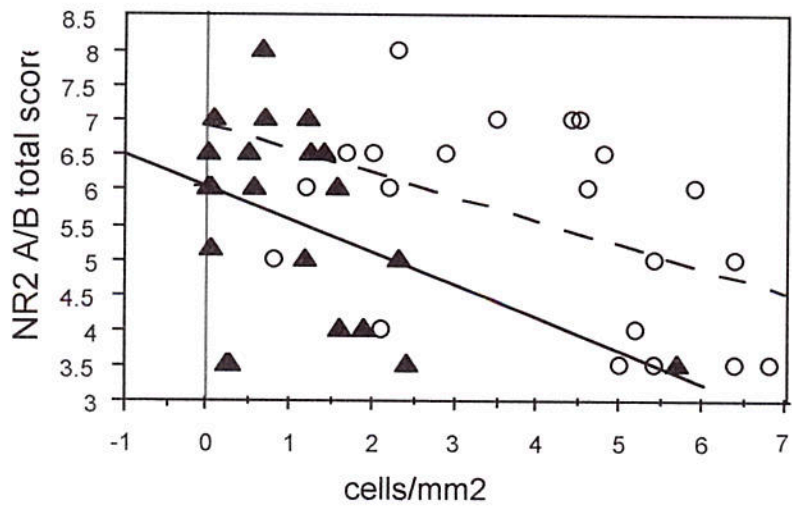
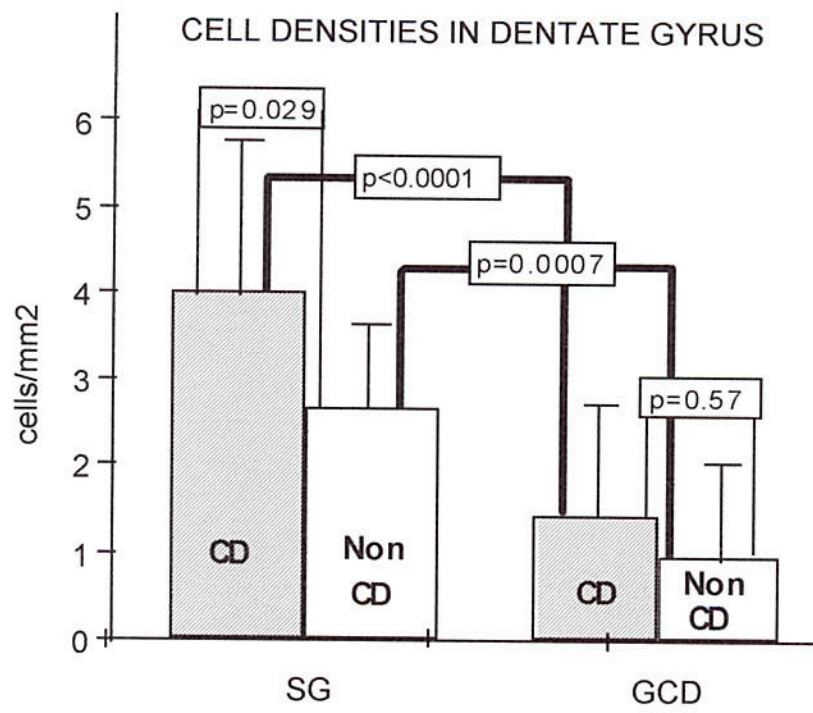


Figure 6





## **CORRELAÇÃO ENTRE EXTENSÃO DA DISPLASIA NEOCORTICAL TEMPORAL E DENSIDADE NEURONAL NO HIPOCAMPO**

Hilbig A, Ying Z, Babb TL, Najm I, Wylie C, Lüders H.

### **RESUMO**

As displasias corticais (DC) são atualmente reconhecidas como uma das principais causas de epilepsia neocortical focal. A co-existência de displasia neocortical e esclerose hipocampal têm sido descrita de forma cada vez mais freqüente em pacientes com epilepsia temporal. Apesar de termos conhecimento que as anormalidades arquiteturais das DC podem estar isoladas em apenas um giro, podem ser distribuídas em uma ou mais camadas e podem apresentar uma densidade variável de neurônios aberrantes, pouco se conhece sobre os mecanismos que contribuem para sua epileptogênese focal. O presente estudo documenta características citológicas e de receptores de glutamato em 23 pacientes consecutivos com epilepsia temporal com o objetivo de definir uma escala semi-quantitativa para anormalidades microscópicas em displasia cortical do lobo temporal. Essa escala foi baseada na estimativa de neurônios displásicos positivos para receptor NMDA (NR2 A/B) em áreas de displasia cortical. O grau de displasia cortical no neocórtex temporal foi correlacionado com grau de perda de células piramidais no hipocampo em pacientes submetidos a cirurgia devido a epilepsia temporal. Nós também comparamos as densidades de células granulares (CG) e dispersão de CG em pacientes com DC (n=23) com 12 hipocampos de pacientes que não apresentavam DC no neocórtex temporal. Nós testamos a hipótese que características da esclerose hipocampal podem ser relacionadas com a presença e extensão de DC no neocórtex temporal. Resultados: 1) DC foi positivamente relacionada com perda neuronal média no cornu de Ammon, sendo maior em CA1, CA3 e pró-subículo; 2) DC não esteve correlacionada com densidade neuronal em CA2 e subículo; 3) DC foi negativamente correlacionada tanto com densidade de CG como com dispersão de CG na camada

molecular da fásia denteada. Essa escala semi-quantitativa de DC permitirá correlações com vários outros parâmetros nesses pacientes, tais como: MRI, MRS, EEG, semiologia clínica, prognóstico. Esses dados sugerem que algumas formas de esclerose hipocampal podem ter fatores etiológicos em comum com displasia cortical temporal.

## INTRODUÇÃO

Esclerose hipocampal (EH) é o achado histológico mais freqüente em epilepsias temporais refratárias ao tratamento clínico, sendo uma anormalidade isolada em torno de dois terço dos pacientes (2, 6, 26). No outro terço, diversos tipos de patologia neocortical são os achados principais. Entretanto, é fato bem conhecido que alguns desses pacientes apresentam lesão tanto no neocórtex temporal como no hipocampo, com uma incidência que varia de 11% (6) a 20% (13), sendo denominada então de dupla patologia (dual pathology). Esse termo refere-se, geralmente, a associação de EH com lesões tumorais no neocórtex temporal (6, 4, 22, 23). Displasia Cortical (DC) é atualmente reconhecida como um dos achados mais importantes em epilepsia neocortical focal, mas a incidência de DC em neocórtex temporal de pacientes com EH não têm sido bem estudada. A maioria dos estudos estão baseados em séries de DC predominantemente extra-temporal (7, 27) e geralmente com diagnóstico baseado em estudos de Ressonância Magnética (7, 9, 27), que não é acurada para diagnóstico de DC microscópica (4, 13, 22).

A presença de DC ocorre como conseqüência genética ou intra-útero de diferentes fatores etiológicos e resulta em um espectro de alterações morfológicas que está na dependência do estágio de desenvolvimento que o insulto ocorre (20,28). A perda do controle durante processo de proliferação, migração, diferenciação terminal, morte celular programada e remodelagem sináptica, pode contribuir para o desenvolvimento de DC (5, 20). Entretanto, de que forma as DCs focais tornam-se epileptogênicas e como essas áreas podem posteriormente modificar o



desenvolvimento cerebral pós-natal, são questões ainda mal compreendidas.

Glutamato é o neurotransmissor excitatório predominante no cérebro. Alguns estudos (3, 14, 15, 29, 33) têm sugerido que uma alteração nos receptores de glutamato pode levar a um aumento da transmissão glutamatérgica em epilepsia. Recentemente, Ying et al. (31) descreveram que neurônios displásicos expressam diferencialmente uma subunidade do receptor de glutamato (NMDAR2 A/B), que não está expresso em neurônios corticais não-displásicos no homem. A combinação heteromérica de NR2A/B e NR1 em neurônios displásicos pós-sinápticos pode aumentar a função de canais NMDA. A técnica imuno-histoquímica (ICC) permite a identificação desses receptores contendo NR2A/B e eles podem ser estimados como uma fração dos neurônios neocorticais temporais. A nossa hipótese é de que um aumento no número e distribuição de neurônios positivos para NR2A/B pode estar relacionado com grau e severidade da displasia neocortical focal. Essa hipótese tem sido cogitada em neocórtex epiléptico usando co-imunoprecipitação de NR1-NR2A/B (19) e coloração por dupla imunofluorescência com NR1 e NR2 A/B em neurônios displásicos individuais (32). A hipótese específica desse estudo é que existe uma relação entre displasia cortical focal microscópica em neocórtex temporal e perda neuronal e distribuição alterada de neurônios no hipocampo e giro denteado de pacientes com epilepsia temporal refratária. Essa associação foi medida utilizando uma análise semi-quantitativa de neurônios positivos para NR2A/B. Nós também comparamos os achados no grupo com DC com outro grupo de pacientes com epilepsia temporal devido a esclerose hipocampal e sem anormalidades no neocórtex (grupo não-DC).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram estudadas 35 ressecções de lobo temporal com neocórtex e hipocampo intactos provenientes de pacientes com epilepsia temporal refratária submetidos a tratamento cirúrgico no Programa de Epilepsia da "The Cleveland Clinic Foundation" entre junho de 1996 e dezembro de 1998. Nossa amostra incluiu 23 pacientes com

achados histopatológicos de displasia cortical no neocórtex temporal (grupo DC) e 12 ressecções com apenas esclerose hipocampal (EH). Pacientes com outros diagnósticos foram excluídos. Todos os pacientes foram avaliados no pré-operatório com história, exame neurológico, monitorização contínua com vídeo-EEG de escalpo, avaliação neuropsicológica e teste do amobarbital intracarotídeo para determinação da linguagem e memória. Registros invasivos de EEG com eletrodos profundos ou grades subdurais foram realizados quando necessário. Ressonância Magnética foi realizada 4 a 6 semanas antes da cirurgia em todos os pacientes utilizando equipamento Siemens 1.5 Tesla Vision System. Múltiplos cortes coronais com imagens T1, T2 e FLAIR, imagens sagitais T1, axial T2 e imagens helicoidais foram adquiridas de todos os pacientes. Dados clínicos e achados de neuroimagem foram revisados por dois dos investigadores (IN e AH).

#### Análise do Hipocampo

O hipocampo foi analisado com cortes corados com cresyl violeta (CV) para revisão histopatológica (30 $\mu$ m) e para medidas quantitativas de densidade celular (10 $\mu$ m). A densidade de células piramidais foi baseada em técnica morfométrica com correção de Abercrombie realizada nas diferentes áreas do Corno de Ammon (CA1, CA2, CA3, CA4 e prosubículo) e depois foi determinada uma média para estimar a perda celular total como descrito previamente (1). As densidades das células granulares no estrato granuloso (SG) da fásia denteada e a densidade de dispersão das células granulares (GCD) a partir do estrato granuloso foram baseadas na contagem de células granulares usando uma grade ocular com 10X10 quadrados, com uma magnificação total de 400X (objetiva de 40X; comprimento do tubo 1,0X; ocular 10X). A área mais dispersa das porções retas (superior ou inferior) da fásia denteada foi selecionada para contagem nos limites da grade. Nós consideramos como estrato granuloso todas as células dentro dos primeiros 125 micrômetros acima da zona subgranular. Todas as células acima desse ponto, desde a camada molecular interna até a fissura do hipocampo, foram contadas como células granulares dispersas. A



densidade total estimada da fásia denteada foi obtida somando o SG e CGD. Os hipocampos de ambos os grupos (DC e não-DC) foram avaliados da mesma maneira por dois investigadores (AH e ZY).

#### Análise da Neocórtex Temporal e Imuno-histoquímica

Amostras do neocórtex temporal foram avaliadas utilizando coloração de cresyl violeta (CV) e imuno-histoquímica (ICC) para subunidades de receptores de glutamato NMDA: 1) anticorpo monoclonal NMDAR2A/B (Chemicon, Inc); 2) anticorpo monoclonal NMDAR1 (PharMingen, Inc.). O anticorpo primário NR2A/B é feito em coelho contra peptídeos dos 20-aminoácidos do C-terminal da subunidade NMDA2A que reconhece tanto subunidades NR2 A como NR2 B. O anticorpo NR1 é feito em camundongo contra a região transmembrana de todas as 8 variantes de NMDAR1. Todo o tecido foi processado exatamente da mesma maneira, com o mesmo tempo em cada reagente e com o mesmo batch de anticorpos, pelos mesmos investigadores, para evitar variações técnicas na densidade final da coloração. Deve ser enfatizado que mesmo incubações por períodos mais longos no anticorpo primário NR2 A/B foram testados e não determinaram falsa coloração.

O tecido cerebral era recebido fresco da sala cirúrgica, após ter sido separado material para diagnóstico neuropatológico, e vários blocos eram seccionados para permitir boa amostragem de todo o neocórtex recebido. Blocos de aproximadamente 7mm eram fixados por 36 horas em paraformaldeído a 4%, a 4°C de temperatura, crioprotégidos em sucrose tamponada a 20% e seccionados em criostato com espessura de 30µm. Após corte em criostato, o tecido era colocado em espaços individuais de 3ml, em placas de cultura de tecido, contendo 0,05M Tris de solução salina (TBS, pH 7,6). Os cortes eram processados livres, imediatamente, e lavados em TBS entre cada etapa: 1) 5 minutos em 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10% metanol em TBS; 2) 60 minutos em soro de cabra normal a 1,5% para bloqueio; 3) 18 horas de pernoite em movimento a temperatura ambiente no anticorpo primário (NR2 A/B: 1:200; NR1: 1:400); 4) 35 minutos em anticorpo secundário biotinizado específico (ABC kit, laboratórios Vector);

5) 8 minutos em 0,05% 3,3'- diaminobenzidina (DAB) em 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em TBS para corar o complexo reativo em pratos de Petri ; após lavados em TBS frio para terminar a reação; 6) o tecido era montado em lâminas com banho de gelatina, secos ao ar livre por várias horas e então cobertas com lamínula. Experimentos controle foram feitos por omissão do anticorpo primário usando o mesmo protocolo de coloração: nenhuma coloração específica foi visualizada na ausência do anticorpo primário.

#### Caracterização Da Displasia Neocortical Temporal

Baseado na coloração por CV, o neocórtex temporal displásico foi caracterizado de acordo com os seguintes critérios: falta de organização laminar, tanto horizontal como vertical, presença de aglomerados de neurônios desorganizados e dismórficos, muitos sendo maiores que os neurônios normais, e apresentando uma intensa coloração, tanto no corpo celular como nos seus processos, para substância de Nissl. Os neurônios displásicos apresentavam muitos dendritos basilares e apicais bem corados sem uma orientação unipolar em direção à superfície pial (Fig.1-C, G). Esses achados eram ocasionalmente limitados a poucas camadas, mas de forma mais freqüente, espalhadas por todas as camadas corticais em determinadas áreas do neocórtex temporal. A presença de neurônios heterotópicos, isolados ou agrupados, na substância branca abaixo das áreas displásicas, e um aumento do número de neurônios na camada molecular, foram achados freqüentes. Entretanto, não foram considerados como critério para displasia focal. Células balonadas estiveram presentes em três casos. Não existiam alterações macroscópicas na nossa amostra.

Todo o neocórtex considerada como não displásico foi proveniente de pacientes diagnosticados como epilepsia hipocampal que não tinham evidência de crises originadas no neocórtex temporal durante avaliação pré-operatória. No exame histopatológico, com coloração CV, apresentavam laminação horizontal e vertical bem preservadas com 6 camadas corticais distintas (Fig.1-A). A primeira camada ou camada molecular era virtualmente livre de neurônios. Camadas 2 e 4 apresentavam pequenos neurônios densamente arranjados, enquanto a camada 3, 5 e 6



apresentavam neurônios maiores. Os neurônios normais apresentaram coloração homogênea com CV e seus dendritos apicais apontavam para superfície pial (Fig.1-E).

#### Análise Semi-Quantitativa De Positividade Para NR2 A/B

O número de neurônios positivos para NR2 A/B foi variável em áreas displásicas, e foram estimadas por uma escala ordinal semi-quantitativa. Cada amostra (em média 4 lâminas com 30 $\mu$ m cada) do neocórtex temporal foi analisada por dois observadores independentes (AH e YZ) bem treinados em análise de NR2 A/B-ICC. Se existia discordância entre os observadores, um terceiro investigador (TB) avaliava as amostras. Três critérios confiáveis foram estabelecidos: 1) distribuição de neurônios imunorreativos na amostra (% do córtex com neurônios positivos para NR2 A/B); 2) número de camadas corticais que apresentavam neurônios NR2 A/B positivos; e 3) intensidade da coloração com NR2 A/B. Nós determinamos pontos para cada critério como segue: (A) Distribuição de NR2 A/B: 0,5= menos de 10%; 1,0= entre 10 e 30%; 2,0= entre 30 e 70%; 3,0= mais de 70% da amostra; (B) Número de camadas com neurônios NR2 A/B positivos: 1,0= uma ou duas camadas; 2,0= mais de duas camadas; (C) Intensidade da coloração: 1,0= fraca; 2,0= moderada; 3,0= forte. Nós somamos esses três critérios em um único denominado escore total de NR2 A/B que variou de 2,5 a 8,0. Baseado no escore total e cada critério utilizado para compô-lo, nós comparamos o grau de NR2 A/B com os dados da contagem de células do hipocampo analisado proveniente do mesmo paciente. Nós também analisamos as diferenças na densidade e dispersão de células granulares entre dois grupos (DC e não-DC).

## **RESULTADOS**

O perfil clínico, dados demográficos e neuroimagem dos pacientes de ambos os grupos (DC e não DC) estão resumidos na tabela 1. A idade no momento da cirurgia, idade de início das crises e fatores de risco foram similares em ambos os grupos. O foco epileptogênico foi localizado no lobo temporal em todos os pacientes

por meios não-invasivos ou invasivos. A RM foi sensível para identificar esclerose hipocampal ipsilateral (DC:67%; não-DC:83%) e mostrou atrofia hipocampal bilateral apenas no grupo não-DC (9%). A presença de displasia cortical no neocórtex temporal foi sugerida em 11 pacientes do grupo DC (52%), principalmente pela perda de definição entre substância branca e cinzenta.

#### Caracterização Imuno-histoquímica

Tanto o neocórtex de pacientes com displasia como de pacientes sem displasia apresentavam neurônios positivos para NR1 distribuídos em todas as camadas corticais. Entretanto, algumas células displásicas apresentavam coloração mais intensa, o que não pode ser quantificado. O neocórtex temporal de pacientes sem DC não apresentava coloração de neurônios normais para NR2 A/B (Figura 1 B-F). Em contraste, todos os pacientes do grupo com DC apresentaram positividade variável para NR2 A/B em neurônios dismórficos em áreas de displasia. A coloração foi positiva tanto no corpo do neurônio como em seus processos (Fig. 1 D-H). Baseado na implicação funcional desse achado, nossa análise semi-quantitativa levou em consideração as características mais importantes para estimar um aumento de NR2 A/B: a quantidade de receptor a nível celular (intensidade de coloração) e a distribuição de neurônios positivos para NR2 A/B (porcentagem de neurônios positivos e número de camadas) no neocórtex temporal.

#### Achados no Hipocampo e Comparação com Grau de Displasia Cortical

Todos os pacientes apresentavam certo grau de perda celular no hipocampo. A perda celular média no corno de Ammon variou entre 26% e 78% entre os pacientes com DC (n=23) e entre 38% e 80% no grupo sem DC, sem diferenças significativas entre os dois grupos nos diferentes campos estudados. Usando análise de regressão linear, nós encontramos que o grau de positividade para NR2 A/B (escore total NR2 A/B) esteve positivamente correlacionado com a perda celular média no corno de Ammon ou o grau de esclerose hipocampal. Quanto maior o escore de NR2 A/B, maior a perda celular no hipocampo ( $p=0,038$ ) (Figura 4). O número de camadas corticais



( $p=0,0014$ ) e a porcentagem de neurônios positivos ( $p=0,024$ ) foram melhor correlacionados com a perda celular no hipocampo, do que a intensidade da coloração ( $p=0,5$ -NS). A análise de cada área do hipocampo mostrou que o escore total de NR2 A/B esteve melhor correlacionado com a perda celular nos seguintes campos: CA1 ( $p=0,0005$ ), CA3 (0,01), e prosúbicula ( $p=0,07$ ), com um padrão muito similar a esclerose hipocampal isolada. Não houve correlação entre o grau de NR2 A/B e nenhuma das características demográficas nos pacientes com CD.

Um achado freqüentemente observado no hipocampo, em pacientes com epilepsia mesial temporal, é uma dispersão das células granulares no giro denteado (1, 11), com a presença de quantidade variada de células granulares na camada molecular (Fig. 3 A, B). Esse achado tem sido sugerido como uma forma de distúrbio da migração neuronal (11). Nós comparamos a densidade de células granulares no estrato granuloso (SG) e a quantidade de GCD com a severidade da DC medida pelo escore total de NR2A/B. Existiu uma correlação negativa entre positividade para NR2 A/B e densidade celular no SG ( $p=0,047$ ) (Figura 5). Nós também comparamos as densidades de células granulares do SG e GCD entre os dois grupos (DC e não-DC). No grupo com DC, o valor médio da densidade no SG foi de 4,0 células/mm<sup>2</sup> e diferiu significativamente do grupo sem DC, que foi de 2,63 células/mm<sup>2</sup> ( $p=0,029$ ). No grupo com DC, o valor médio de GCD foi de 1,37 cél./mm<sup>2</sup>, enquanto no grupo não-DC foi de 0,94 cél./mm<sup>2</sup> ( $p=0,57$ ) (Figura 6).

## DISCUSSÃO

Alterações estruturais no neocórtex representam um achado morfológico freqüente em epilepsias neocorticais focais refratárias ao tratamento clínico (9, 26, 30). Displasia cortical representa um espectro de alterações neuropatológicas devido a um desarranjo do processo normal de desenvolvimento que pode ocorrer em vários estágios da vida gestacional (20). As displasias corticais focais têm sido objeto de extensivo estudo nos últimos anos e diversas classificações já foram propostas baseadas em características morfológicas e possíveis fatores etiológicos (20, 25). Um

espectro de discretas alterações microscópicas tem sido descrito em espécimes cirúrgicas: desorganização da laminação cortical, aglomerados neuronais através das camadas corticais, aumento do número de neurônios na camada molecular e neurônios heterotópicos isolados na substância branca (12). Entretanto, o significado patológico que pode ser atribuído a esses achados permanece controverso. Displasias corticais por si só não levam a crises, e a principal questão a ser respondida é qual característica dessa desorganização estrutural está associada com hiperexcitabilidade funcional e porque essas alterações são tão freqüentemente associadas a epilepsias refratárias às medicações convencionais. Uma das explicações possíveis é que neurônios displásicos variam em suas propriedades fisiológicas intrínsecas, que são originadas a partir da composição da membrana celular e seus canais iônicos (8, 24). A modificação na composição dos canais iônicos pode levar a uma hiperexcitabilidade por aumento da resposta a neurotransmissores excitatórios.

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro e possui dois grupos principais de receptores ionotrópicos: (1) receptores AMPA, que são responsáveis pela despolarização rápida através da abertura de canais de sódio e potássio; e (2) receptores NMDA, que são responsáveis pela despolarização neuronal prolongada (10, 24). As funções dos receptores NMDA têm sido consideradas necessárias para o desenvolvimento de crises. Até o momento, duas famílias de receptores NMDA foram identificadas: NMDAR1 (NR1) e NMDAR2 (NR2). NR2 apresenta quatro subunidades (A-D) codificada por diferentes genes enquanto NR1 tem oito variantes por cisalhamento (A-H). Canais homoméricos formados a partir da combinação de moléculas NMDAR1 são completamente funcionais mas a corrente de glutamato através desses canais é pequena. A presença isolada de NMDAR2 não forma canais iônicos funcionais. Entretanto, quando NR2 está combinado com NR1, existe a formação de canais funcionais e com condutância muito maior em resposta tanto ao glutamato como ao NMDA (8, 10, 24). Nós encontramos neurônios positivos para NR2 A/B apenas no neocórtex temporal com algum grau de alteração



morfológica, implicando que esses receptores de glutamato não estão presentes ou estão em quantidades muito pequenas no neocórtex temporal normal em humanos. Dessa forma, a hiperexcitabilidade em áreas de displasia cortical pode ser causada e/ou aumentada pela combinação heteromérica de subunidades NR1 e NR2A/B. Foi também recentemente descrito que a expressão da subunidade NR2A/B está fortemente correlacionada com epileptogenicidade in situ registrada por eletrodos subdurais (21). Desde que NR2A/B ocorre apenas em neurônios displásicos, ele pode ser um indicador “funcional” de displasia cortical e a presença desses receptores NR1-NR2A/B pode predizer uma população neuronal com hiperexcitabilidade funcional.

Esclerose hipocampal com sua reorganização axo-dendrítica são situações bastante estudadas e associadas com epilepsia hipocampal focal (12, 16). Na esclerose hipocampal (EH), a distribuição da perda neuronal, gliose e neosinaptogênese no hipocampo é relativamente estereotipada, com o maior perda celular ocorrendo em áreas de CA1, CA4, CA3 e fásia denteada, enquanto CA2 permanece mais preservado. Não existe perda neuronal significativa no complexo subicular. Entretanto, existem questões relevantes a serem respondidas sobre a patogênese da EH. Nós não sabemos se um dano cerebral específico ou uma doença do desenvolvimento como DC pode predispor a EH. Talvez o resultado mais interessante do nosso estudo foi que existe uma correlação positiva entre CD e EH, com um padrão similar ao da perda celular da EH isolada. Esses achados sugerem que EH e algumas formas de DC podem ter um fator etiológico comum, como a predisposição genética. Outra possibilidade é que o aumento de NR2A/B possa ser uma consequência da epilepsia. Os fatos contra essa hipótese são: 1) nós não encontramos correlação entre a idade de início ou duração da epilepsia e o número de neurônios positivos para NR2A/B no grupo com DC; 2) nós não encontramos positividade para NR2 A/B no neocórtex temporal de pacientes do grupo sem DC, embora todos esses pacientes tenham uma história longa de crises epiléticas.. Entretanto, nosso estudo não pode excluir definitivamente a possibilidade que crises

hipocampais, propagando para o neocórtex temporal adjacente, possa contribuir para a positividade ao receptor. As evidências são mais fortes em favor da primeira hipótese de dupla patologia e epileptogenicidade, com EH e DC.

Outro achado interessante está relacionado a dispersão de células granulares. A hipótese que a organização diferente do giro denteado em pacientes com EH, especialmente a dispersão de células granulares, possa representar uma forma de distúrbio da migração neuronal não pode ser confirmada. Nós esperávamos encontrar uma correlação positiva entre GCD e grau de displasia cortical, mas na realidade, a correlação foi negativa. Existiu uma diferença significativa entre a densidade de células granulares no SG, mas não encontramos diferença significativa na densidade de GCD entre os grupos (com e sem DC). É possível que a severa perda de células granulares em pacientes com EH isolada possa ter confundido a GCD, pois existiam menos células para serem dispersas, o que pode em parte ser responsável para uma correlação negativa entre a extensão da DC e GCD.

Concluindo, nós demonstramos que o neocórtex temporal com displasia cortical microscópica expressa diferentes grau de receptores NMDA, aparentemente com aumento da concentração de receptores NR1 e com expressão diferenciada de NR2A/B. Esse achado está significativamente correlacionado com a perda celular no hipocampo e sugere uma forma de dupla patologia: EH típica, que é definitivamente epileptogênica e displasia cortical temporal de vários graus, que pode apresentar hiperexcitabilidade. Entretanto, em ressecções com EH típica, mesmo as formas mais severas de DC costumam ser bem mais “leves” do que aquelas ressecções em que existe DC isolada, principalmente extra-temporal. É provável que essas DC de lobo temporal representem anormalidades de etiologia genética e/ou intrauterina que tenham alguma coincidência com mecanismos levando a morte celular esteriotipada da EH. É importante mencionar que na EH humana os receptores NR2 A/B estão aumentados na camada molecular (17), e ambos NR1 e NR2 estão aumentados em ratos epiléticos pós kainato intra-hipocampal (18).



### Legendas das Figuras

**Figura 1.** A, E: Microfotografia do lobo temporal posterior corada com CV mostrando citoarquitetura normal dessa região. Em A podemos diferenciar 6 camadas corticais e substância branca subcortical (WM) e em E a morfologia normal de neurônios da camada 3. B: a mesma região do córtex adjacente com NR2 A/B-ICC mostrando ausência de coloração em células normais e F mostrando magnificação 30 $\mu$ m adjacente a E. C, G: área de displasia cortical no lobo temporal posterior de outro paciente mostrando córtex sem organização laminar, alguns neurônios maiores que normal e todos os neurônios fortemente corados para substância de Nissl. G: magnificação da camada 2/3 neurônios dismórficos apontando em diferentes direções. D: coloração com NR2 A/B-ICC mostrando agrupamento de neurônios positivos na camada 2 e coloração de neurônios ao longo da córtex. H: magnificação de NR2 A/B, 30 $\mu$ m adjacente a G mostrando coloração no corpo e dendritos. Barra de calibração: A-D: 200 $\mu$ m; E-H: 40 $\mu$  m.

**Figura 2.** A-D: Microfotografia do neocórtex temporal de pacientes com diferentes graus de DC. A: córtex normal sem coloração com NR2 A/B. B: córtex displásica com neurônios fracamente corados; C: neurônios displásicos moderadamente corados com NR2 A/B; D: neurônios fortemente corados com NR2 A/B. Barra de calibração: 60 $\mu$ m.

**Figura 3.** Microfotografia da fásia denteada (CV) de diferentes pacientes. A: estrato granuloso bem definido, mas com uma redução importante da densidade de células granulares. B: células granulares dispersas na camada molecular interna (GCD). H= hilo. Barra de calibração: 100 $\mu$  m.

**Figura 4.** Correlação entre a severidade da DC medida pela coloração NR2 A/B-ICC e a média de perda celular (%) no corno de Ammon. Quanto maior o escore de NR2 A/B, maior a perda de neurônios piramidais no hipocampo ( $p=0,038$ ).

**Figura 5.** Correlação entre a severidade da DC medida pela coloração NR2 A/B-ICC e a densidade celular no giro denteado (células/mm<sup>2</sup>) contadas com coloração com CV.

Nenhuma das medidas utilizadas para medir grau de DC (escore total, distribuição e intensidade de coloração com NR2 A/B-ICC) foi positivamente relacionado com densidade celular do SG ou GCD. Ao contrário, foram negativamente correlacionados. A linha sólida e os triângulos pretos mostram uma correlação negativa entre escore total de NR2 A/B e GCD ( $p=0,047$ ). A linha hachurada e os círculos abertos mostram uma correlação negativa entre escore total de NR2 A/B e densidade celular no SG ( $p=0,036$ ).

**Figura 6.** Densidades celulares (células/mm<sup>2</sup>) no giro denteado nos grupos com DC e sem DC. O valor médio das densidades celulares no SG é significativamente diferente entre os dois grupos ( $p=0,029$ ). A densidade de células dispersas (GCD) não foi significativamente diferente ( $p=0,057$ ).



Tabela 1: Dados demográficos dos pacientes, características clínicas e de neuroimagem. Duas MRI não estavam disponíveis para revisão no grupo com DC.

	<b>grupo CD</b> (n=23)	<b>grupo sem CD</b> (n=12)
<b>Idade na cirurgia</b> (média ± SD) mediana	27.3 (±10.8) 26	26.3 (±10.9) 30
<b>Início das crises</b> (média ± SD) mediana	11.2 (±11.5) 8	10.6 (±7.2) 12.5
<b>Semiologia das Crises</b> Aura Crises parciais complexas Crises TCG	15/23 (65%) 19/23 (83%) 16/23 (69%)	9/12 (75%) 11/12 (92%) 3/12 (25%)
<b>Lado da Cirurgia</b> Esquerdo Direito	13/23 (56%) 10/23 (44%)	4/12 (33%) 8/12 (66%)
<b>Fatores de Risco</b> Convulsão febril Infecção Trauma craniano	10/23 (43%) 4/23 (17%) 5/23 (22%) 1/23 (4%)	6/12 (50%) 4/12 (33%) 1/12 (8%) 1/12 (8%)
<b>Características da MRI</b> Atrofia hipocampal ipsilateral bilateral  aumento de sinal no hipocampo (FLAIR) ipsilateral bilateral anormalidades extra-hipocampais	16/21 (76%) 14/21 (67%) 2/21 (9%)  16/21 (76%) 11/21 (52%) 5/21 (24%) 11/21 (52%)	10/12 (83%) 10/12 (83%) 0/12  7/12 (58%) 4/12 (33%) 3/12 (25%) 0/12

## Hippocampal Chemical Anatomy in Pediatric and Adolescent Patients with Hippocampal or Extrahippocampal Epilepsy

Z. Ying<sup>a</sup> T.L. Babb<sup>a,b</sup> A. Hilbig<sup>a</sup> E. Wyllie<sup>b</sup> A. Mohamed<sup>b</sup> W. Bingaman<sup>c</sup>  
R. Prayson<sup>d</sup> S. Staugaitis<sup>a,d</sup> I. Najm<sup>b</sup> H.O. Lüders<sup>b</sup>

Departments of <sup>a</sup>Neurosciences, <sup>b</sup>Neurology, <sup>c</sup>Neurosurgery, and <sup>d</sup>Pathology, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio, USA

### Key Words

Hippocampal sclerosis · Development · Synaptic reorganization · Mossy fibers · Glutamate receptor 1 ·  $\gamma$ -Aminobutyric acid · Immunocytochemistry

### Abstract

We determined whether age or seizure types were associated with hippocampal neuron loss, mossy fiber (MF) and GABAergic synaptic reorganizations or postsynaptic receptor densities. Children and adolescents were grouped into: (1) nonhippocampal sclerosis (non-HS; n = 11) and (2) hippocampal sclerosis (HS; n = 11). The most important results showed that: (1) regardless of the etiology of the seizures, there were greater cell losses in Ammon's horn with older ages in years; in the non-HS group, cell losses were greater with the older ages or with longer epilepsy durations; however, in the HS patients, the cell losses were not related to the patients' ages or epilepsy durations; (2) in both HS and non-HS, CA1 had greater cell losses than CA4; (3) in HS, CA1 and CA4 had greater cell losses than those in non-HS; (4) in non-HS, MF sprouting was greater with ages or with longer epilepsy durations; by contrast, in HS, MF sprouting was not related to the patients' age or epilepsy duration;

(5) densities for AMPA GluR1, GABA-A $\beta$  and for GABA axonal terminals were positively increased with age. These findings support the hypothesis that hippocampal cell losses and aberrant synaptic reorganizations are greater in the hippocampi of adolescents than in children, even for non-HS pathologies.

Copyright © 1999 S. Karger AG, Basel

### Introduction

Temporal lobe epilepsy is a common neurological disorder that is defined behaviorally as a sequence of discrete behaviors including loss of consciousness, staring and upper body movements that rarely generalize into major seizures. To define the anatomical pathology or 'seizure site' is extremely important to establish the essential cellular mechanisms for chronic seizures. By studying the en bloc temporal lobes with quantitative cell counts, Babb and Brown [1986] reported that hippocampal sclerosis (HS) was the sole pathology in 65% of cases of temporal lobe epilepsy. That is, HS is the most commonly encountered lesion in partial complex epilepsy. Several scientific investigations have well characterized the HS in adult patients [Babb et al., 1984a, b; Babb and Brown, 1986;

**KARGER**

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 1999 S. Karger AG, Basel

Accessible online at:  
www.karger.com/journals/dne

Z. Ying, MD, PhD  
Department of Neurosciences NC-30, Cleveland Clinic Foundation  
9500 Euclid Avenue  
Cleveland, OH 44195 (USA)  
Tel. +1 216 4452689, Fax +1 216 4447927, E-Mail yingz@ccsmtp.ccf.org



Babb, 1991; Gloor, 1991; Armstrong, 1993; Vinters et al., 1993]. The most consistent pathology is severe CA1 and hilar neuron loss. Based on the knowledge of the localization of pathological and epileptogenic tissue to the hippocampal formation [Gastaut, 1953; Sano and Malamud, 1953; Earle et al., 1953] we now know that typical temporal lobe seizures start from abnormal cellular discharges in the hippocampal formation and propagate to the surface of the temporal lobe [Babb et al., 1987]. Finally, surgical excision of the hippocampus reduces or eliminates the temporal lobe seizures, which indicates that the hippocampus is the site for causation of seizures originating in the temporal lobe. The epileptogenicity in neuron-poor HS is most likely due to the reactive synaptogenesis formed in the human epileptic fascia dentata (FD). Following the deafferentation of granule cell (GC) dendrites, new synapses are innervated by aberrant sprouting of GC axons, which has been demonstrated histochemically by Timm sulfide stain [Babb et al., 1988; Cascino et al., 1988; Sutula et al., 1989]. The concept that a recurrent hyperexcitable feedback in the hippocampus could contribute to the epileptogenesis is supported by physiological studies [Wuarin and Dudek, 1996; Mathern et al., 1993; Masukawa et al., 1992; Porkorny and Schwartzkroin, 1991]. Furthermore, numerous studies on surgically resected epileptic hippocampi have demonstrated that up-regulated glutamate receptors were associated with the excitatory synaptic reorganization in the FD [Babb et al., 1996; Lynd-Balta et al., 1996; Mathern et al., 1996b; Ying et al., 1998].

Many seizures start during childhood, and these childhood seizures can be associated with HS; however, other children have extrahippocampal lesions such as cortical dysplasia, infection, infarction and tumors. In contrast to the extensive research on adult temporal lobe epilepsy, only a few studies have investigated the association of hippocampal neuron loss and synaptic reorganization at increasing ages ranging from 1 to 18 years to compare between HS and extrahippocampal pathologies. Mathern et al. [1994, 1996a] reported the typical pattern of neuronal cell loss and mossy fiber (MF) sprouting in childhood mesial temporal epilepsy. However, in children and adolescents suffering drug-refractory habitual seizures of various pathologies, the associated hyperexcitable circuits have not yet been evaluated by modern anatomical and neurochemical probes on the resected hippocampal specimens. The present study was designed to study hippocampi from children and adolescents to provide ample quantitative analyses of: (1) the percentage of neuronal cell loss; (2) the amount of supragranular glutamatergic MF sprout-

ing; (3) the densities of AMPA GluR1 subunit proteins in the inner molecular layer (IML) of the FD; (4) the densities of supragranular GABAergic axon hyperinnervations, and (5) the densities of GABA-A $\beta$  receptor subunit proteins in the IML of the FD. These data may add to understanding if hippocampal chemical anatomy in HS is increased over years and whether the hippocampal transmitter systems are significantly different between HS and non-HS primary pathologies with increasing age.

## Materials and Methods

### *Patient Information*

Patients with intractable seizures were routinely evaluated in the Comprehensive Epilepsy Program at the Cleveland Clinic Foundation with diagnostic preoperative epilepsy surgery protocols that have previously been published in detail [Morris, 1992]. A total of 22 hippocampi used in this study were from a consecutive series collected from January 1996 to February 1998. The patients' ages ranged from 1 to 18 years (average 9.2 years). Based on clinical and neuroimaging data, the patients were catalogued into two pathological categories: (1) non-HS (n = 11), which included congenital prenatal abnormalities such as hemimegalencephaly (1 patient), cortical dysplasia (2 patients), prenatal germinal matrix hemorrhage (1 patient), tumors (3 patients), prenatal cerebral artery infarction (1 patient), tuberous sclerosis (1 patient), hamartoma (1 patient) and acquired postnatal pathologies such as Rasmussen's syndrome (1 patient); (2) HS (n = 11) when the seizures showed clinical, partial mesial temporal lobe features or neuroimaging demonstrated hippocampal atrophy.

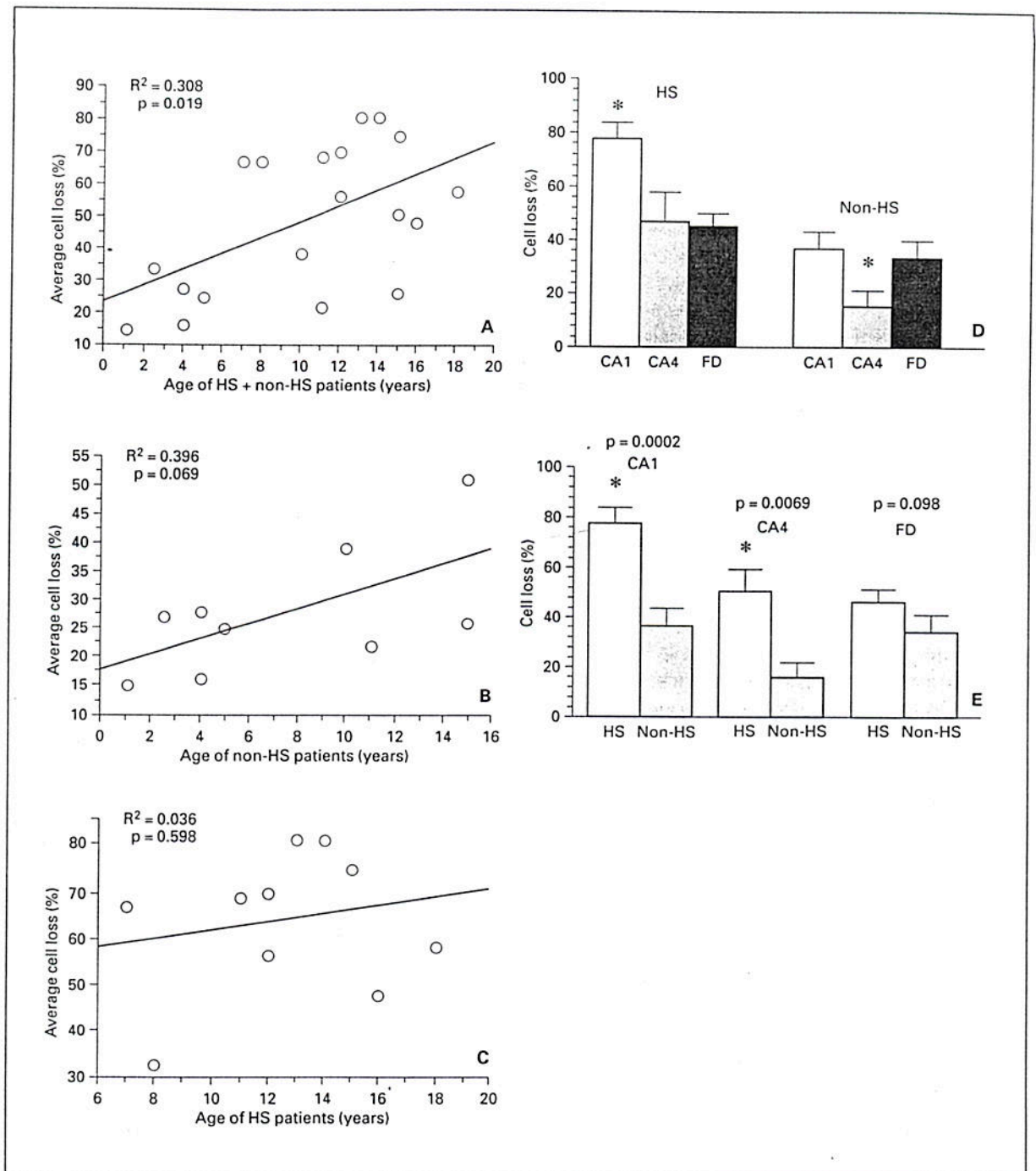
### *Tissue Preparation*

Hippocampi resected during surgery for the treatment of temporal lobe epilepsy were received fresh from the neurosurgeon in the operating room. Two adjacent blocks of 3 mm thickness were cut in the coronal plane and placed in various fixatives. For immunocytochemistry (ICC), one block was immersion fixed in a 100-ml volume of cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 2 days. After fixation, the block was cryoprotected in cold 20% phosphate buffer sucrose overnight, frozen in dry ice and cryostat sectioned. For the Timm procedure, the second block was placed in a 100-ml volume of 0.1% sodium sulfide/4% glutaraldehyde in 0.12 M Millonig's buffer (pH 7.3) with 0.0002% calcium chloride and stored at 4°C for 2–3 days. The Timm block was then transferred to 20% Millonig's buffer sucrose overnight before frozen cryostat sectioning.

### *Immunocytochemistry*

Three antisera were used in this study: GluR1 polyclonal antibody (1:50 dilution, from rabbit; Chemicon), GABA-A $\beta$  monoclonal antibody (1:50 dilution, from mouse; Boehringer Mannheim) and glutamate decarboxylase (GAD, 1:6,000 dilution, from sheep) [Oertel et al., 1981]. The ICC protocols were similar to previously described procedures [Babb et al., 1989; Ying et al., 1998]. Briefly, cryostat sections were cut at 30  $\mu$ m and placed in individual 3-ml tissue culture wells containing 0.05 M Tris-buffered saline (TBS, pH





**Fig. 1. A** Scatterplot and linear regression correlation ( $R^2$ ) comparing the percentage of Ammon's horn cell loss and the patients' (HS and non-HS) age in years. A positive, statistically significant correlation was found, indicating that with older age there was a greater percentage of cell losses in Ammon's horn ( $R^2 = 0.308$ ,  $p = 0.019$ ). **B** Scatterplot and linear regression correlation ( $R^2$ ) comparing the percentage of Ammon's horn cell loss and the non-HS patients' age in years. There was a strong tendency that with older age there was a greater percentage of cell losses in Ammon's horn ( $R^2 = 0.396$ ,  $p = 0.069$ ). **C** Scatterplot and linear regression correlation ( $R^2$ ) compar-

ing the percentage of Ammon's horn cell loss and the HS patients' age in years. No correlation was found ( $R^2 = 0.036$ ,  $p = 0.598$ ), indicating that the cell losses in Ammon's horns of the HS patients were relatively static at whatever time the hippocampal pathology occurred, which could be from ages before 6 to 18 years and were always at greater percentages for HS than non-HS patients (see **D**, **E**). **D** Bar graph illustrating the cell losses in the subfields of Ammon's horn (CA1, CA4 and FD) from the pathogenic categories non-HS and HS. In HS patients, compared to CA4 and the FD, CA1 had the greatest cell losses ( $p = 0.0015$  and  $p = 0.0008$ , respectively). The cell losses in



7.6). TBS was used as the rinsing buffer throughout the ICC staining procedure. Free-floating sections were processed for ICC immediately following cryostat sectioning: (1) TBS rinses (3 changes) between each step: 5 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10% methanol in TBS; (2) 60 min in a blocking solution of 1.5% normal serum in TBS; (3) 18 h overnight at room temperature in primary antisera diluted in TBS containing 1% blocking serum; (4) 35 min in diluted biotinylated species-specific anti-IgG (goat antirabbit; horse antimouse; rabbit antisheep; ABC kit, Vector Laboratories). To visualize the immunoreactive complex, the sections were reacted for 8 min in 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS. The reaction was terminated by several rinses of cold TBS. The tissue sections were then mounted on chromium alum gelatin-coated slides, air dried for several hours and coverslipped. Control experiments for ICC were performed by omission of primary antibodies using the same staining protocol as mentioned above; no specific ICC stainings were seen in the absence of specific primary antibodies.

#### *Neo-Timm's Histochemistry*

Specific staining of zinc to visualize MFs (axons of GCs) was achieved by the neo-Timm procedure. The 30- $\mu$ m sections, adjacent to those used for ICC, were thaw-mounted on subbed slides, air dried and immersed in a 'physical developer' in a 26°C water bath maintained in the darkroom. The developer consisted of 180 ml of a 50% gum arabic solution, 30 ml of an aqueous solution of 7.56 g citric acid and 7.05 g sodium citrate, 90 ml of an aqueous solution of 5.3 g hydroquinone and 1.5 ml of a 17% silver nitrate solution. The two different development times that yielded an identical pattern were used to confirm that the staining was specific to MFs: the development time for light sections was 45 and 55 min for dark sections based on visual inspection in the darkroom with a small lamp. The slides were then removed from the developer and first washed in distilled water for 10 min and then in running tap water for 10 min to stop the reaction. The sections were air dried, dehydrated in alcohol and coverslipped.

#### *Data Analysis*

**Cell Counts.** All hippocampi were processed with cresylecht violet stains for cell counts on 10- $\mu$ m-thick sections at  $\times$  400 using grid morphometric techniques [Babb et al., 1984a, b]. The percentage of Ammon's horn cell loss was compared to autopsy controls obtained by averaging the percentage of cell loss in the subfield of Ammon's horn (i.e. CA1, CA2, CA3 and CA4). The GCs of the FD were also counted and compared to autopsy controls.

**Visual Assessment of Molecular Layer Sprouting Identified by Neo-Timm Stains.** Two skilled observers (Y.Z. and T.B.) independently and blindly classified the visual pattern of MF terminals in the

the CA4 and the FD were not different ( $p = 0.82$ ). By contrast, in non-HS patients, CA1 and the FD showed greater neuron losses than CA4 ( $p = 0.03$  and  $p = 0.0023$ , respectively); however, the cell losses in CA1 and the FD were not different ( $p = 0.73$ ). **E** Bar graph comparing the cell losses in the subfields between the group of non-HS patients and the group of HS patients. Two subfields, CA1 and CA4, showed greater cell losses in the HS patients. The cell losses in the FD were not statistically different between HS and non-HS, although they were less in non-HS.

IML using an ordinal scale of the MF densities, scored from 0 (none) to 3 (highest), as described and illustrated in figure 2. The observers' scores could be modified up or down by 0.5 increments if the pattern looked slightly more or less than the examples illustrated in figure 2. The two scores were averaged into a final ordinal value for the IML MF terminals.

**Quantitative Densitometry of Immunoreactivities of GluR1, GAD and GABA-A $\beta$ .** The gray value (white to black range) densities of GluR1, GAD and GABA-A $\beta$  stained by ICC in the IML were analyzed using computer outlines and densitometry. Analog images were detected on an objective black-white charge-coupled device monochrome camera (Hamamatsu) attached to a Leitz microscope. The charge-coupled device outputs were then digitized into a Macintosh computer and analyzed using imaging software (NIH image, version 1.58). The IMLs were outlined on the monitor using a digital cursor, and the average gray values (0–255 scale) of all pixels within the areas were automatically calculated. All gray values for immunoreactivities (IRs) of GluR1, GAD and GABA-A $\beta$  were entered into an Excel database on a personal computer. Due to the severe GC loss in sclerotic hippocampus, it was impossible to directly relate the densitometric values to dendritic receptor densities of GluR1 and GABA-A $\beta$  or axonal densities of GAD. However, it was possible to estimate dendritic densities of each hippocampus by correcting for the GC losses. Hence, the gray values of the IRs for GluR1, GAD and GABA-A $\beta$  were divided by the GC densities determined by cell counts. This procedure was an estimate of dendritic densities. For regression analyses, the individual patient's Timm score and the gray values (divided by the GC densities) of GluR1, GAD or GABA-A $\beta$  were plotted against the patient's age using DeltaGraph Professional (DeltaPoint, Monterey, Calif., USA) and considered significantly different at a minimum confidence level of  $p < 0.05$ . To compare group differences of Timm densities or subfield cell losses between HS and non-HS, student's *t* test was used to determine significant differences.

## Results

### *Hippocampal Neuronal Cell Losses*

To determine if the cell losses in the hippocampus were correlated with increased age in children and adolescents with recurrent seizures, the average Ammon's horn cell losses were compared to the patients' ages in linear regression analyses regardless of the etiologies of the seizures, and the results are shown in figure 1A. The percentage of cell losses in Ammon's horn was positively correlated with the age of patients ( $R^2 = 0.308$ ,  $p = 0.019$ ). That is, with older age in years, there were significantly greater cell losses in the hippocampi. Similar regression analyses were then performed separately in non-HS patients and HS patients. In the non-HS patients (fig. 1B), the average Ammon's horn cell losses tended to correlate with the patient's age in years ( $p = 0.069$ ), which indicates that in those patients, there may be progressive cell loss over years in the hippocampus. By contrast, in the HS patients (fig. 1C), the amount of cell loss did not correlate with



patient age, indicating that the cell loss in the hippocampi of the HS patients was static over age ( $p = 0.598$ ). However, it is important to note that the youngest HS patient was 6 years old, as defined by clinical diagnosis.

Within each group of the patients, the average cell losses in the subfields of CA1, CA4 and the FD are compared in figure 1D. In HS patients, the CA1 region has the greatest cell losses compared to CA4 and the FD ( $p = 0.0015$  and  $p = 0.0008$ ; respectively). However, the cell losses in the CA4 and the FD are not significantly different ( $p = 0.82$ ). In non-HS patients, the subfields CA1 and FD had a significantly greater neuron loss than CA4 ( $p = 0.03$  and  $p = 0.0023$ , respectively). However, the cell losses in CA1 and in the FD were not significantly different ( $p = 0.73$ ). In both groups of patients, CA1, the well-known Sommer sector, had the greatest cell losses.

Figure 1E demonstrates the average cell losses in the subfields of CA1, CA4 and the GC losses in the FD to compare non-HS and HS patients. It is clear that in the HS group, cell losses in CA1 and CA4 are significantly greater compared to the non-HS group ( $p = 0.0002$  and  $p = 0.0069$ , respectively). In fact, there is no significant difference in the cell losses in FD when comparing HS with non-HS patients ( $p = 0.098$ ).

To determine if cell losses in the hippocampus were related to epilepsy duration or seizure onset, average Ammon's horn cell losses were compared to epilepsy duration or seizure onset in linear regression analyses in non-HS and HS patients separately. In non-HS patients, the average Ammon's horn cell losses tended to positively correlate with epilepsy duration in years ( $p = 0.088$ ,  $n = 9$ ) but did not correlate with age at seizure onset ( $p = 0.58$ ). By contrast, in HS patients, the amount of cell loss did not correlate with either epilepsy duration or seizure onset ( $p = 0.967$  and  $p = 0.68$ , respectively). That is, the cell losses in the hippocampus were increased with longer periods of seizures only in the non-HS patients, and the cell losses were not related to age at seizure onset.

#### *Supragranular MF Sprouting*

Figure 2 illustrates the main features of GCs (fig. 2A, C and E) and their MF innervations (fig. 2B, D and F) in the FD. Figure 2A and B gives examples of virtually nonsclerotic FD: the GC layer is highly compact with distinct borders (fig. 2A) and few Timm-stained MFs into the IML (fig. 2B). By contrast, figure 2E and F gives typical examples of severe sclerotic FDs: the GC layers have poorly defined borders due to severe losses of GCs (fig. 2E), and the MFs highly sprouted into the IMLs, forming dark bands (fig. 2F). Figure 2C and D shows

examples from more mildly sclerotic hippocampi. The GC (fig. 2C) is dispersed and less compact than that of the non-sclerotic hippocampus shown in figure 2A. The supragranular (IML) MF sprouting is obvious (fig. 1D) but is less dense compared to that of the severe HS shown in figure 1F (IML).

To determine if the supragranular (IML) MF neoinnervation was related to age in children or adolescents, the MF densities determined by ordinal scale visual assessments were compared to the patients' ages (both HS patients and non-HS patients) in a linear regression analysis regardless of the etiologies of the seizures. Figure 3A shows that MF sprouting positively correlated with the age of the patients ( $R^2 = 0.346$ ,  $p < 0.0032$ ). That is, with older ages in years, there was significantly greater supragranular MF sprouting in the IML. Similar regression analyses separated for patient groups showed positive correlations between age and IML MFs. In the non-HS group (fig. 3B), supragranular MF sprouting correlated with the patients' age in years at only  $p = 0.08$  confidence level, which is a strong linear trend with only  $n = 11$ . Similarly, in the HS group (fig. 3C), MF sprouting also tended to positively correlate with the patients' age ( $p = 0.18$ ;  $n = 10$ ). That is, the aberrant MF innervation was age progressive in both HS and non-HS patients. Note that the youngest HS patient was 6 years old.

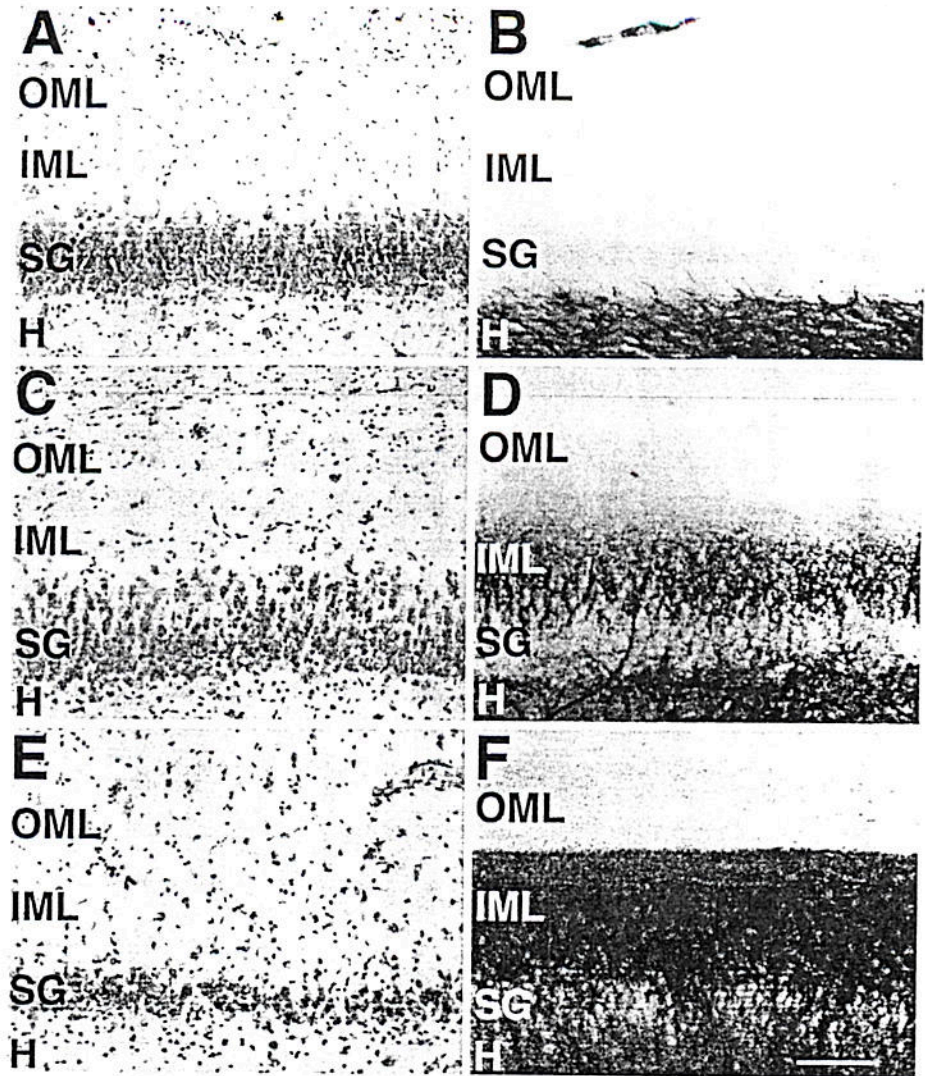
Figure 3D illustrates the differences in densities of IML MF terminals for HS and non-HS patients. The MFs were significantly greater in the HS patients ( $p = 0.046$ ).

To determine in which subfield the cell losses were related to the amount of supragranular MF sprouting, the Timm scores were compared to cell losses in subfields of CA1, CA4 and the FD using linear regression analyses in both HS and non-HS groups. Supragranular MF sprouting was significantly related only to the cell losses in the FD for the HS patients (fig. 3E,  $p = 0.016$ ). That is, IML MF sprouting was not related to cell losses in either CA1 or CA4 in the HS patients and was not related to cell losses in any of the subfields of the non-HS patients.

To determine if supragranular MF neoinnervations in the hippocampus were related to epilepsy duration or age of seizure onset, MF densities determined by ordinal scale visual assessments were compared to epilepsy duration or to age of seizure onset in linear regression analyses in non-HS and HS patients separately. In non-HS patients, MF sprouting tended to correlate with epilepsy duration in years ( $p = 0.077$ ,  $n = 11$ ) but did not correlate with the age of seizure onset ( $p = 0.62$ ). By contrast, in HS patients, MF sprouting did not correlate with either epilepsy duration or seizure onset ( $p = 0.93$  and  $p = 0.84$ , respectively).



**Fig. 2.** Photomicrographs that illustrate the semiquantitative visual assessments of supragranular MF sprouting stained by Timm's stain in the IML (**B**, **D** and **F**) and the staining patterns for GCs (**A**, **C** and **E**). Each panel is orientated with the outer molecular layer (OML) on top, followed by the IML, the stratum granulosum (SG) and the hilus (H). The typical non-HS specimens (**A**, **B**) showed that GCs were densely packed, forming a well-laminated layer (**A**); there is little MF sprouting into the supragranular layer (**B**) which was scored as 1 by visual assessment. The typical mild-HS specimen (**C**, **D**) showed that the GCs were dispersed into the molecular layer, and the cells were less densely packed as those of the non-HS specimen shown in **A**. In this mild-HS specimen, the amount of MF sprouting was obvious but moderate which was scored as 2 by visual assessments. The typical severe-HS case is demonstrated in **E** and **F**. Despite the severe GC loss (**E**), there was a dense supragranular MF innervation (**F**) on the IML dendrites which was scored as 3. Scale bar = 100  $\mu$ m.



That is, supragranular MF neoinnervations were greater with longer periods of epilepsy only in the non-HS patients but were not related to age of seizure onset in either non-HS or HS patients.

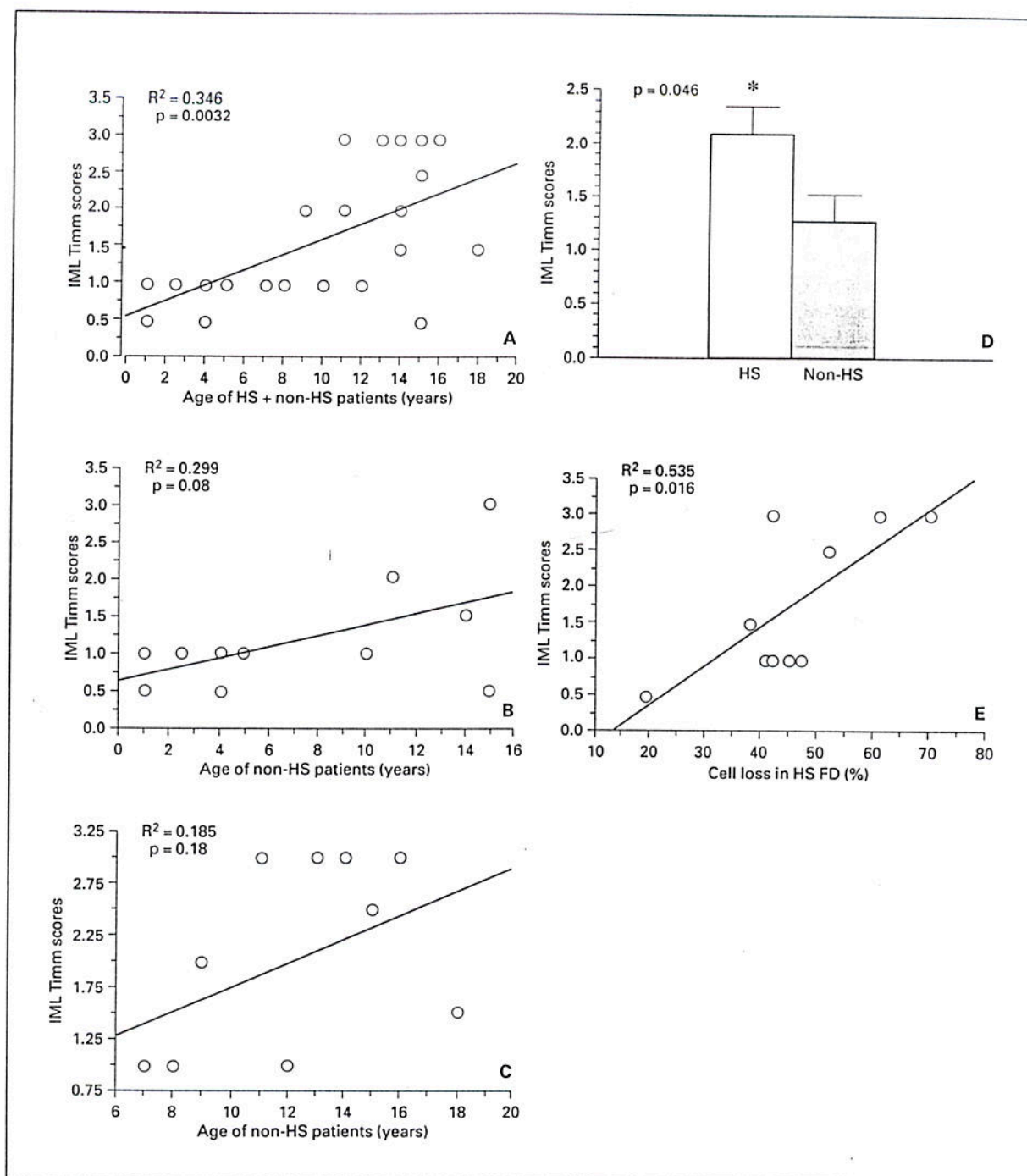
#### *Increased AMPA GluR1 Receptors in the FD*

Figure 4 illustrates the pattern of AMPA receptor GluR1 subunit densities (ICC, fig. 4C, D) in relation to MF innervation (Timm stain, fig. 4A, B) in a nonsclerotic FD (fig. 4A, C) and a sclerotic FD (fig. 4B, D). In the nonsclerotic FD, there was little MF sprouting into the IML (fig. 4A) and relatively faint GluR1 labeling in the molecular layer and granule cell bodies (fig. 4C). By contrast, sclerotic FD shows aberrant Timm-stained supragranular MFs (fig. 4B: IML only) and greater GluR1 staining throughout the height of the molecular layer and

granule cell bodies (fig. 4D). It is important to note that increased GluR1 staining was not limited to the IML where MFs innervated aberrantly. Instead, the GluR1 subunit staining was increased throughout the length of the dendritic zone. There is a tendency for the greater densities of GluR1 in the IML with older age in years; however, it is not statistically significant.

#### *GABAergic Axon Sprouting and Increased GABA-A $\beta$ Receptor in the FD*

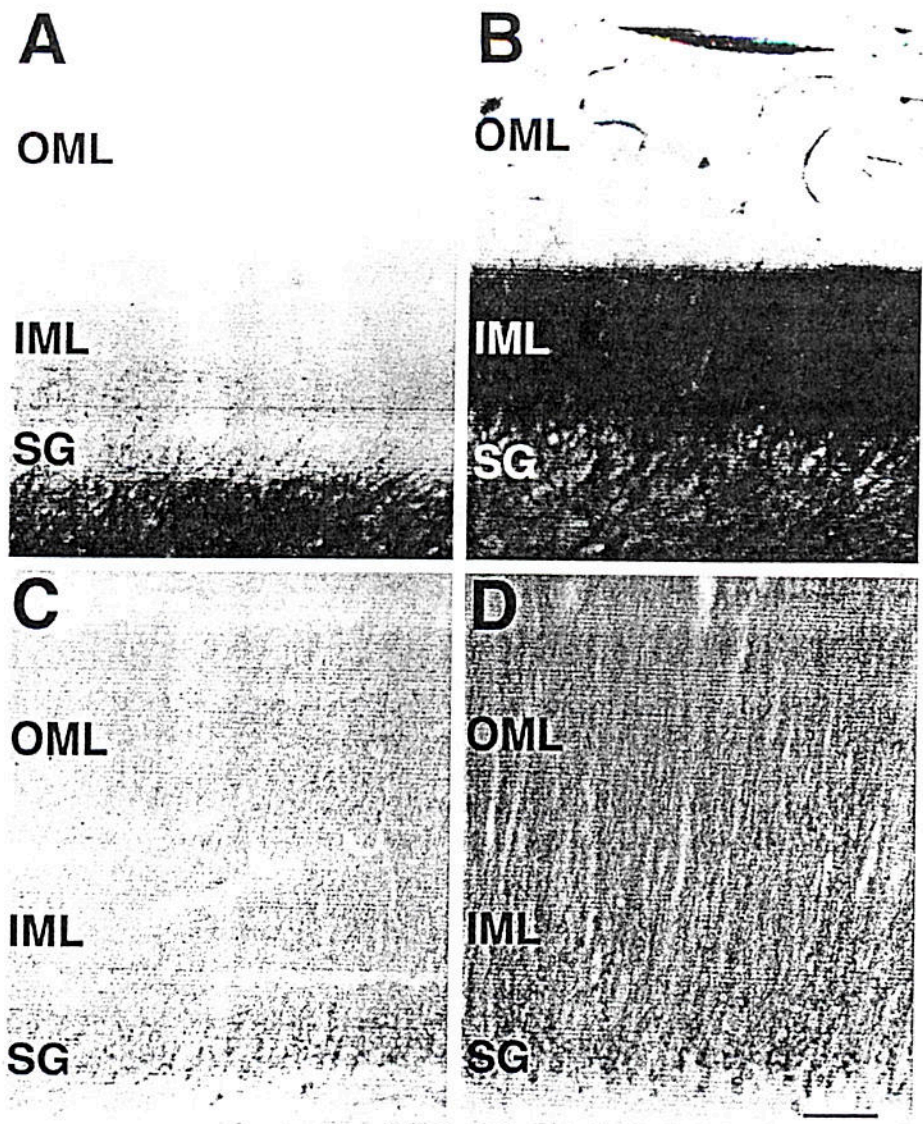
Figure 5 illustrates typical examples of the differential GAD-stained axonal densities (fig. 5C, D) and GABA-A $\beta$  receptor densities (fig. 5E, F) in relation to adjacent MF innervation patterns (fig. 5A, B) in the FD of a nonsclerotic hippocampus (fig. 5A, C and E) and a sclerotic hippocampus (fig. 5B, D and F). The patterns of supragranular



**Fig. 3.** **A** Scatterplot and linear regression correlation ( $R^2$ ) comparing the amount of supragranular MF sprouting in the IML (scored by visual assessments) and the patients' (HS and non-HS) age in years. A positive correlation was found indicating that with older ages there were more aberrant IML MFs ( $R^2 = 0.346$ ,  $p = 0.0032$ ). **B** Scatterplot and linear regression correlation ( $R^2$ ) to compare MF sprouting in the IML and the non-HS patients' age in years. There was a strong tendency that with older ages there were more IML aberrant MFs ( $R^2 = 0.299$ ,  $p = 0.08$ ) in non-HS patients. **C** Scatterplot and linear regression correlation ( $R^2$ ) to compare IML MF sprouting and HS

patients' age in years. There was a strong tendency that with older ages there were more IML aberrant MFs ( $R^2 = 0.299$ ,  $p = 0.08$ ) in HS patients. **D** Bar graphs illustrating means  $\pm$  SEM of the scores for the IML MFs for HS and non-HS patients. The higher score reflects greater IML MF densities. The scores for HS are significantly higher ( $p = 0.046$ ) compared to non-HS. **E** Scatterplot and linear regression correlation ( $R^2$ ) comparing IML MF sprouting and the percentage of GC losses in the FD. A positive correlation was found indicating that with more cell losses in the FD, there were more IML aberrant MFs ( $R^2 = 0.535$ ,  $p = 0.016$ ).





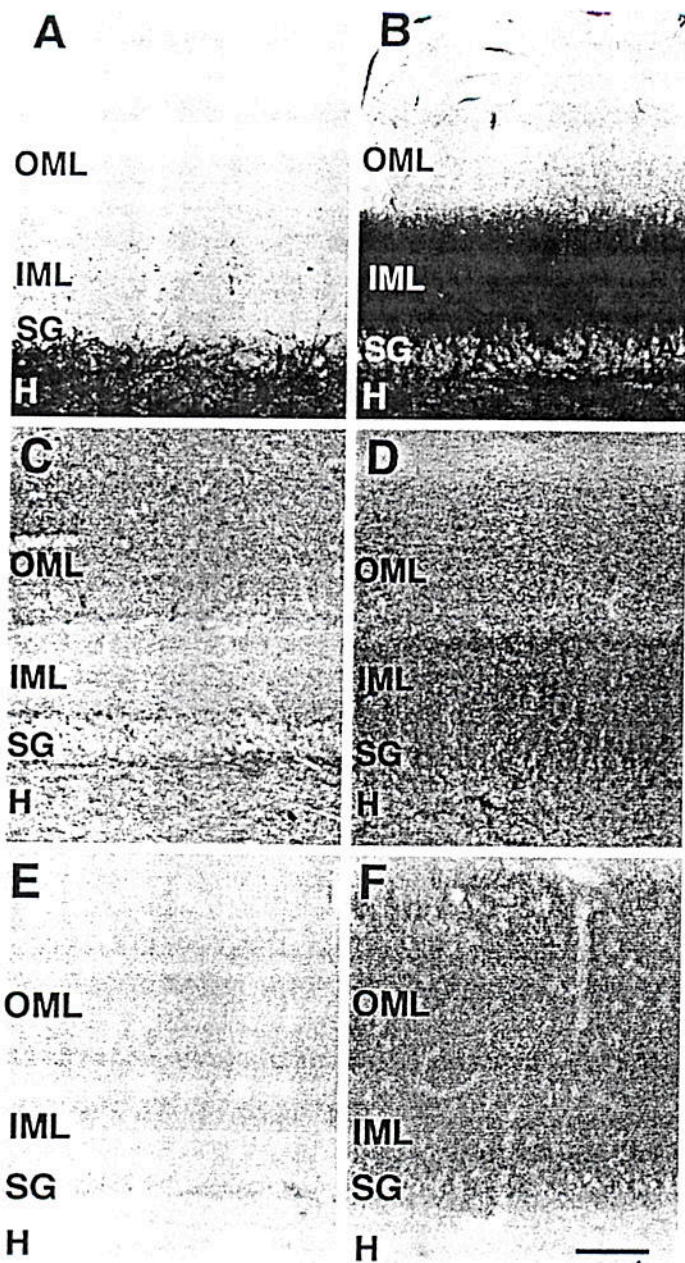
**Fig. 4.** Photographs to compare supragranular MF sprouting (**A, B**) and AMPA GluR1 receptor subunit (**C, D**) in an HS specimen (**A, C**) and a non-HS specimen (**B, D**). The non-HS specimen showed that there is little MF sprouting into the supragranular layer (**A**), and GluR1 was only faintly stained uniformly in the molecular layer (**C**) where the dendrites of GCs are located. The HS specimen showed that there was a dense supragranular MF aberrant innervation that was limited to the IML (**B**) and a dramatic increase in GluR1 staining in the entire molecular layer and GC bodies (**D**). OML = Outer molecular layer; SG = stratum granulosum. Scale bar = 100  $\mu$ m.

MF sprouting in non-HS (fig. 5A) and HS (fig. 5B) are similar to those demonstrated in figure 4. In the nonsclerotic hippocampus, the axonal terminals labeled by GAD IR are less dense in the IML and outline a relatively empty band in the IML (fig. 5C). By contrast, the GAD IR was always greater in the IML of the sclerotic hippocampus (fig. 5D), forming a darker band in the IML. The GABA-A $\beta$  receptor subunit densities were evenly distributed throughout the whole molecular layer in either the nonsclerotic hippocampus (fig. 5E) or the sclerotic hippocampus (fig. 5F). However, the density was greater in the sclerotic hippocampus for the entire molecular layer. That is another example, as with GluR1 (fig. 4D), where receptor

up-regulation or increased density occurs throughout the dendritic length and does not match the limited zone of hyperinnervation in the IML.

The GAD IRs and the GABA-A $\beta$  IRs in the IML were compared to the patients' ages in linear regression analyses regardless of the etiologies of the seizures. The results are shown in figure 6A and b. Both GAD densities and GABA-A $\beta$  densities tended to increase with older age. However, the positive correlations were not statistically significant with only 9 and 10 patients in each analysis ( $p = 0.08$  and  $p = 0.06$ , respectively), which represents strong trends.





**Fig. 5.** Photographs to compare IML MF sprouting (**A, B**), GAD IR (**C, D**), and GABA-A $\beta$  IR (**E, F**) in the molecular layer of a non-HS specimen (**A, C** and **E**) and an HS specimen (**B, D** and **F**). In this typical non-HS specimen, there was little IML MF sprouting (**A**), the IML GAD IR puncta was less densely packed, outlined as an empty band, and the GABA-A $\beta$  IR was faint throughout the molecular layer. However, in the HS specimen there was a dense IML MF innervation (**B**), the IML GAD IR puncta was denser, which formed a darker band in the IML (**D**), and the IR for GABA-A $\beta$  was increased throughout the whole molecular layer (**F**). OML = Outer molecular layer; SG = stratum granulosum; H = hilus. Scale bar = 100  $\mu$ m.

To determine if the GAD IRs or GABA-A $\beta$  IRs in the IML were related to cell losses in subfields, the GAD densities or the GABA-A $\beta$  densities were compared to cell losses in CA1 and in CA4. The GABA-A $\beta$  densities significantly correlated with greater cell losses in CA4 (fig. 6D,  $p = 0.02$ ) but did not correlate with the cell losses in CA1 (data not shown). The GAD densities tended to correlate with the cell losses in CA4 (fig. 6C,  $p = 0.09$ ); however, the positive correlation was not statistically significant with only 9 patients.

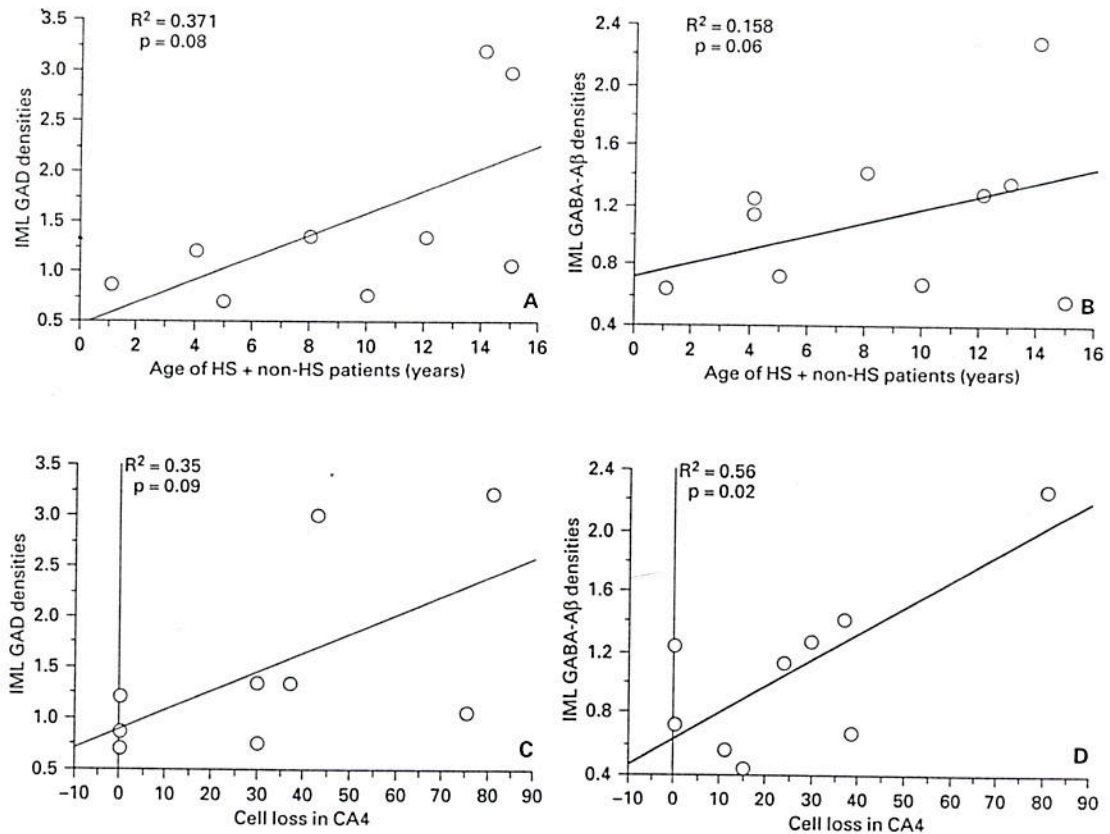
## Discussion

### Neuron Loss

The results of this study demonstrate several important findings concerning whether childhood seizures are associated with neuronal cell loss and supragranular MF sprouting in the hippocampus. Specifically, in both HS and non-HS patients, we found that CA1 had greater cell loss than CA4. This pattern of Ammon's horn cell loss is similar to the previous findings in adult patients with hippocampal epilepsy [Babb et al., 1984a, b; 1991; Mathern et al., 1995d]. Compared with non-HS patients, the cell losses in the subfields CA1 and CA4 were greater in the HS patients. Similarly, supragranular MF sprouting was greater in the HS patients than that in the non-HS patients. Such results strongly indicate that regardless of the etiology of the seizures, childhood epilepsies can be associated with neuronal losses and aberrant supragranular MF innervation; however, the hippocampi appeared to be less pathological in the non-HS patients.

Hippocampi from epileptic children secondary to extrahippocampal congenital or acquired lesions (non-HS patients) showed that with older age in years, there were greater neuronal losses in Ammon's horn and greater supragranular MF sprouting in the IML. Of greater importance, in this group of patients, the percentage of cell losses or the MF sprouting appeared to be correlated with epilepsy durations ( $p = 0.088$  and  $p = 0.077$ , respectively) but was not correlated with the onset of seizures. It is worth considering that in our study the number of patients is small, the  $p$  value of 0.077 or 0.088 might be improved to a significance level ( $p = 0.05$ ) when larger samples are studied. By contrast, in the HS patients neither the neuronal cell loss nor the MF sprouting was associated with the duration or the onset of the seizures. Based on our findings, several conclusions can be made: (1) in the HS patients of childhood epilepsies, the hippocampal neuronal losses and supragranular MF sprouting were





**Fig. 6.** **A** Scatterplot and linear regression correlation ( $R^2$ ) to compare the IML GAD IR densities (gray value divided by GC densities) and the age of patients (HS and non-HS) in years. The IML GAD IR densities were correlated with older age; however, it was not statistically significant ( $p = 0.08$ ) with only 9 patients. **B** Scatterplot and linear regression correlation ( $R^2$ ) to compare the IML densities for GABA-A $\beta$  (gray value divided by GC densities) and the age of patients (HS and non-HS) in years. The GABA-A $\beta$  densities in the IML were correlated with older age, very close to statistical significance ( $p = 0.06$ ). **C** Scatterplot and linear regression correlation ( $R^2$ )

to compare the IML GAD IR densities (gray value divided by GC densities) of both HS and non-HS patients and the percentage of cell losses in CA4. The GAD IR densities in the IML were almost significantly correlated with a greater cell loss in CA4 ( $p = 0.09$ ). **D** Scatterplot and linear regression correlation ( $R^2$ ) to compare the IR densities for IML GABA-A $\beta$  (gray value divided by GC densities) of both HS and non-HS patients and the percentage of cell losses in CA4. The GABA-A $\beta$  densities in the IML were significantly correlated with greater cell losses in CA4 ( $p = 0.02$ ).

static and were not progressive with longer periods of the epilepsy; (2) in the childhood epilepsies with congenital or acquired extrahippocampal lesions, the hippocampal neuronal losses and MF sprouting progressively increased with longer epilepsy duration in years.

There are two possible explanations for the association of increased hippocampal cell loss and epilepsy duration. First, compared with HS patients in childhood seizures, the non-HS patients started to have seizures at much younger ages. It is possible that the immature brain is more vulnerable to the insults of seizures, especially dur-

ing certain developmental periods. Consequently, the immature brain may have neuronal death following every episode of seizures at a very young age. It is important to mention that seizure frequency may also play an important role in causing the cell death, i.e. increasing the cell losses. However, such information is not useful since it is difficult to obtain accurate information of seizure frequency from the patients. Several studies in adult mesial temporal epilepsy showed the association of decrease in the CA1 neuron density with seizure histories [Mouritzen-Dam, 1980; Mathern et al., 1995c, d]. Our data from



HS patients of childhood epilepsy did not show such a correlation between greater neuron cell loss and longer epilepsy duration. This could be due to the fact that we studied pediatric HS patients, and the seizure histories are much shorter than those in adult HS patients. Furthermore, in our study, the number of HS pediatric patients was small, and the percentage of CA1 cell loss were clustered in the range of 80–90%. Such a narrow window of CA1 cell loss made the correlation not significant.

#### *MF Sprouting*

The observation that greater MF sprouting was associated with longer epilepsy duration in non-HS patients of childhood seizure is interesting. It raises the possibility that repetitive seizures over an early brain developmental period are sufficient to trigger progressive MF sprouting. The second possibility is that progressive MF sprouting is induced by associated hippocampal damage. Our data would support the idea that the hippocampus, over a certain developmental period, is capable of seizure-associated remodeling because there was no correlation between the MF sprouting and the cell losses for CA1, CA4 and the FD. This notion is in agreement with the previous concept raised by Mathern et al. [1995a] that if a child has seizures associated with congenital or acquired extrahippocampal damage, then there may be a progressive evolution of synaptic reorganization with supragranular MF sprouting that eventually evolves into severe HS and generates independent seizures. By comparison, in the HS patients, the supragranular MF sprouting was correlated with the neuron damage in the FD, but was not correlated with epilepsy duration or seizure onset. Such observations suggest that MF synaptic reorganization in the HS patient is the result of deafferentation of GC dendrites caused by neuronal cell death in the hilus. Since it is impossible to quantify the hilar cell loss, the GC pathology may closely estimate the damage of the complex population of hilar neurons.

#### *Excitation and Inhibition*

The terminals of synaptic reorganized MFs forming asymmetric synapses on dendrites in the IML [Babb et al., 1991] suggest that these MF terminals are functional glutamate-secreting synapses. In this study, we demonstrated that in childhood epilepsy the densities for postsynaptic GluR1 subunit proteins are modified. Regardless of the etiology of childhood seizures, the GluR1 subunit proteins were greater throughout the molecular layer in the sclerotic hippocampus compared with nonsclerotic or mildly sclerotic hippocampus. This indicates that GC

dendrites may be hyperexcitable to all types of glutamatergic inputs which include the perforant path innervating the outer molecular layer and the synaptically reorganized MFs innervating the IML. Such observations are in agreement with previous findings in the studies of adult patients [Babb et al., 1996; Lynd-Balta et al., 1996; Ying et al., 1998; Mathern et al., 1998a, b].

Historically, a reduction of inhibitory function was considered the most parsimonious explanation for hippocampal hyperexcitability, because the hippocampus has divergent and powerful inhibition [Spencer and Kandel, 1961], and it was proposed that there would be reduction of GABAergic neurons in the epileptic hippocampus. However, in both human and animal hippocampal epilepsy, GABA neurons are relatively spared [Babb et al., 1989; Davenport et al., 1990a]. Furthermore, both studies on adult hippocampal epilepsy and animal models of hippocampal epilepsy demonstrated that GABAergic axons had sprouted into the FD of epileptic hippocampus [Mathern et al., 1995b; Davenport et al., 1990b]. In this study, we used ICC to stain GABA axons and postsynaptic GABA-A $\beta$  subunit proteins in the hippocampi of childhood epilepsy. In the sclerotic hippocampus, the GABA axons sprouted and reinnervated dendrites in the IML, similarly to the MFs. The postsynaptic GABA-A $\beta$  proteins were increased throughout the extent of the FD molecular layer compared with nonsclerotic hippocampus. Hence, it is clear that in the hippocampi of childhood epilepsy, the inhibitory GABAergic system was enhanced. Slice electrophysiology studies also supported the notion that the GABA inhibitory system was preserved and hyperinnervated in the epileptic hippocampus [Williamson et al., 1995]. The GABA hyperinnervation may offset concurrent sprouting of recurrent excitation on the same GC, which could result in continuous seizures. The GABA hyperinnervation may also synchronize the membrane potentials of several granule cells, thereby increasing the number of cell firings with the next suprathreshold excitatory input to them.

#### **Acknowledgments**

The authors thank the Pediatric Epilepsy Surgery Program and the Clinical Neurophysiology Laboratory for the precise preoperative diagnoses made on the patients reported in this paper. The research on resected human brain was approved by the Institutional Review Board (approval No. IRB 1263). This work was supported by National Institutes of Health Grants NS-31655 and NS-38150 to T.L.B and KO8 NS-02046 to I.N.



## References

- Armstrong DD (1993): The neuropathology of temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 52:433-443.
- Babb TL (1991a): Research on the anatomy and pathology of epileptic tissue; in Lüders H (ed): *Epilepsy Surgery*. New York, Raven Press, pp 719-727.
- Babb TL, Brown WJ (1986): Pathological findings in epilepsy; in Engel J Jr (ed): *Surgical Treatment of the Epilepsies*. New York, Raven Press, pp 511-540.
- Babb TL, Brown WJ, Pretorius JK, Davenport C, Lieb JP, Crandall PH (1984a): Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 25:729-740.
- Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK (1988): Recurrent excitatory circuits by 'sprouted' mossy fibers into the fascia dentata of human hippocampal epilepsy. *Epilepsia* 29:674.
- Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF (1991b): Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 42:351-363.
- Babb TL, Lieb JP, Brown WJ, Pretorius J, Crandall PH (1984b): Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. *Epilepsia* 25:721-728.
- Babb TL, Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK, Ycoman KM, Kuhlman PA (1996): Glutamate AMPA receptors in the fascia dentata of human and kainate rat hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res* 26:193-205.
- Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Crandall PH (1989): Glutamate-decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci* 9:2562-2574.
- Babb TL, Wilson CI, Isokawa-Akesson M (1987): Firing patterns of human limbic neurons during stereoencephalography (SEEG) and clinical temporal lobe seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 66:467-482.
- Cascino G, Sutula T, Cavazos J (1988): Hippocampal mossy fiber synaptic reorganization in intractable partial epilepsy: A clinicopathologic study. *Epilepsia* 29:684.
- Davenport CJ, Brown WJ, Babb TL (1990a): GABAergic neurons are spared after intrahippocampal kainate in the rat. *Epilepsy Res* 5:28-42.
- Davenport CJ, Brown WJ, Babb TL (1990b): Sprouting of GABAergic and mossy fiber axons in dentate gyrus following intrahippocampal kainate in the rat. *Exp Neurol* 109:180-190.
- Earle KM, Baldwin M, Penfield W (1953): Incisural sclerosis and temporal lobe seizures produced by hippocampal herniation at birth. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 69:27-42.
- Gastaut H (1953): So-called 'psychomotor' and 'temporal' epilepsy. *Epilepsia* 5:59-99.
- Gloor P (1991): Mesial temporal sclerosis: Historical background and an overview from a modern perspective; in Lüders H (ed): *Epilepsy Surgery*. New York, Raven Press, pp 689-703.
- Lynd-Balta E, Pilcher WH, Joseph SA (1996): Distribution of AMPA receptor subunits in the hippocampal formation of temporal lobe epilepsy patients. *Neuroscience* 72:15-29.
- Masukawa LM, Uruno K, Sperling M, O'Connor MJ, Burdette LJ (1992): The functional relationship between antidromically evoked field responses of the dentate gyrus and mossy fiber reorganization in temporal lobe epileptic patients. *Brain Res* 579:119-127.
- Mathern GW, Babb TL, Mischel PS, Vinters HV, Pretorius JK, Leite JP, Peacock WJ (1995a): Childhood generalized and mesial temporal epilepsies demonstrate different amounts and patterns of hippocampal neuron loss and mossy fiber synaptic reorganization. *Brain* 119:965-987.
- Mathern GW, Babb TL, Mischel PS, Vinters HV, Pretorius JK, Leite JP, Peacock W (1996a): Childhood generalized and mesial temporal epilepsies demonstrate different amounts and patterns of hippocampal neuron loss and mossy fiber synaptic reorganization. *Brain* 119:965-987.
- Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Leite JP (1995b): Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. *J Neurosci* 15:3990-4004.
- Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Melendez M, Levesque MF (1995c): The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 21:133-147.
- Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, Melendez M, Pretorius JK (1995d): The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain* 118:105-118.
- Mathern GW, Cifuentes F, Leite JP, Pretorius JK, Babb TL (1993): Hippocampal EEG excitability and chronic spontaneous seizures are associated with aberrant synaptic reorganization in the rat intrahippocampal kainate model. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 87:326-339.
- Mathern GW, Leite JP, Babb TL, Pretorius JK, Kuhlman PA, Mendoza D, Fried I, Sakamoto AC, Assirati JA, Adelson PD, Peacock WJ (1996b): Aberrant hippocampal mossy fiber sprouting correlates with greater NMDAR2 receptor staining. *Neuroreport* 7:1029-1035.
- Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK, Quinn B, Peacock WJ, Babb TL (1994): Children with severe epilepsy: Evidence of hippocampal neuron losses and aberrant mossy fiber sprouting during postnatal granule cell migration and differentiation. *Brain Res Dev Brain Res* 78:70-80.
- Mathern GW, Pretorius JK, Leite JP, Kornblum HI, Mendoza D, Lozada A, Bertram EH III (1998a): Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res* 32:154-171.
- Mathern GW, Pretorius JK, Mendoza D, Lozada A, Leite JP, Chimelli L, Fried I, Sakamoto AC, Assirati JA, Adelson PD (1998b): Increased hippocampal AMPA and NMDA receptor subunit immunoreactivity in temporal lobe epilepsy patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:615-634.
- Morris HH (1992): Summary of epilepsy surgery protocols; in Lüders H (ed): *Epilepsy Surgery*. New York, Raven Press, pp 786-788.
- Mouritzen-Dam A (1980): Epilepsy and neuron loss in the hippocampus. *Epilepsia* 21:617-629.
- Oertel WH, Schmechel DE, Tappaz ML, Kopin IJ (1981): Production of a specific antiserum to rat brain glutamic acid decarboxylase by injection of an antigen-antibody complex. *Neuroscience* 6:2689-2700.
- Porkorny J, Schwartzkroin JEF (1991): Physiologic and morphologic characteristics of granule cells from human and epileptic hippocampus. *Epilepsia* 32:46.
- Sano K, Malamud N (1953): Clinical significance of sclerosis of the cornu ammonis. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 70:40-53.
- Spencer WA, Kandel ER (1961): Hippocampal neuron responses to selective activation of recurrent collaterals of hippocampal axons. *Exp Neurol* 4:149-161.
- Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L (1989): Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 26:321-330.
- Vinters HV, Armstrong DL, Babb TL, Daumas-Duport C, Robitaille Y, Bruton CJ, Farrell MA (1993): The neuropathology of human symptomatic epilepsy; in Engel J Jr (ed): *Surgical Treatment of Epilepsies*. New York, Raven Press, pp 593-608.
- Williamson A, Telfeian AE, Spencer DD (1995): Prolonged GABA responses in dentate granule cells in slices isolated from patients with temporal lobe sclerosis. *J Neurophysiol* 74:378-387.
- Wuarin JP, Dudek FE (1996): Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats. *J Neurosci* 15:438-448.
- Ying Z, Babb TL, Comair YG, Bushey M, Touhalsky K (1998): Increased densities of AMPA GluR1 subunit proteins and presynaptic mossy fiber sprouting in the fascia dentata of human hippocampal epilepsy. *Brain Res* 798:239-246.



## **ANATOMIA QUÍMICA DO HIPOCAMPO EM PACIENTES PEDIÁTRICOS E ADOLESCENTES COM EPILEPSIA HIPOCAMPAL OU EXTRA-HIPOCAMPAL**

Ying Z, Babb TL, Hilbig A, Wyllie E, Mohamed A, Bingaman W, Prayson R, Staugaitis S, Najam I, Lüders H.

### **RESUMO**

Esse estudo determinou o quanto a idade e o tipo de crises foram associados com perda neuronal no hipocampo, reorganização de fibras musgosas e sinapses gabaérgicas, e densidades de receptores pós-sinápticos. Crianças e adolescentes com epilepsia temporal refratária foram agrupados em: (1) sem esclerose hipocampal (non-EH: n=11); e (2) esclerose hipocampal (EH: n=11). Os principais resultados mostraram: (1) independentemente da etiologia da crise, a perda celular no Corno de Ammon foi maior quanto maior a idade do paciente. No grupo non-EH a perda neuronal foi maior com o aumento da idade e com maior tempo de duração da epilepsia. No grupo EH, a perda celular não esteve relacionada com a duração da epilepsia; (2) em ambos os grupos, CA1 teve maior perda celular que CA4. Nos pacientes com EH as perdas celulares tanto em CA1 como em CA4 foram maiores que no grupo sem EH; (3) somente no grupo non-EH o brotamento das fibras musgosas foi maior com o aumento da idade e com duração da epilepsia; (4) as densidades para AMPA GluR1, GABA-A $\beta$  e para terminais axonais GABA foram positivamente relacionados com o aumento da idade. Esses achados sustentam a hipótese que a perda de células hipocampais e a reorganização sináptica aberrante são maiores em adolescentes que em crianças, mesmo para patologias extra-hipocampais.

### **INTRODUÇÃO**

Epilepsia do lobo temporal é uma desordem neurológica comum que é definida semiologicamente por uma seqüência de alteração incluindo, perda de consciência, olhar fixo e automatismos que raramente generalizam em uma crise maior. Para definir o sítio de origem das crises, é extremamente importante estabelecer os mecanismos celulares essenciais para crises crônicas. Através da análise quantitativa com



contagem de células de lobo temporal retirado em bloco, Babb e Brown (1986) relataram a esclerose hipocampal como a única patologia em 65% dos casos de epilepsia do lobo temporal. Portanto, a EH é a lesão mais comumente encontrada em epilepsia parcial complexa. Muitas investigações têm caracterizado a esclerose hipocampal em pacientes adultos (Babb et al., 1984 a, b; Babb e Brown 1986; Babb 1991; Gloor, 1991; Armstrong, 1993; Vinters et al., 1993). O achado mais consistente é uma severa perda neuronal em CA1 e hilo.

Baseados no conhecimento da localização hipocampal da patologia e do tecido epileptogênico (Gastaut, 1953; Sano e Malamud, 1953; Earle et al., 1953), nós agora sabemos que as crises típicas do lobo temporal começam a partir de descargas na formação hipocampal e se propagam para a superfície do lobo temporal (Babb et al. 1987). Finalmente, a excisão cirúrgica do hipocampo reduz ou elimina as crises do lobo temporal, o que indica que o hipocampo é o sítio da maioria das crises originadas no lobo temporal. A epileptogenicidade em uma área pobre de neurônios na EH é provavelmente devida a uma sinaptogênese reativa que se forma na fásia denteada (FD) humana. Seguindo a deafferentação dos dendritos das células granulares (GC), novas sinapses são inervadas por um brotamento aberrante de axônios das células granulares como demonstrado em preparações coradas histoquimicamente pela técnica de Timm (Babb et al., 1988; Cascino et al., 1988; Sutula et al., 1989). O conceito de que uma retroalimentação recorrente hiperexcitável no hipocampo poderia contribuir para a epileptogênese foi sustentada por estudos fisiológicos (Wuarin e Dudek, 1996; Mathern et al., 1993; Masukawa et al., 1992; Porkorny e Schwartzkroin, 1991). Posteriormente, numerosos estudos em hipocampos ressecados cirurgicamente têm demonstrado que um aumento de receptores de glutamato está associado a reorganização sináptica excitatória na fásia denteada ( Babb et al., 1996; Lynd-Balta et al., 1996; Mathern et al., 1996b; Ying et al., 1998).

Epilepsias que se iniciam durante a infância podem estar associadas com EH, entretanto, também podem estar associadas a lesões extra-hipocampais como

displasia cortical, infecções, trauma e tumores. Em contraste com os numerosos estudos em epilepsia temporal em adultos, apenas poucos estudos têm investigado a associação de perda neuronal no hipocampo e reorganização sináptica em crianças de diferentes idades para comparar entre EH e patologias extra-hipocampais. Mathern et al. (1994, 1996b) descreveram o padrão típico de perda neuronal e brotamento de fibras musgosas (FM) em epilepsia mesial temporal da infância. Entretanto, os circuitos hiperexcitáveis no hipocampo proveniente de crianças e adolescentes sofrendo crises habituais devido à várias patologias ainda não foram devidamente avaliadas através de técnicas neuroquímicas modernas. O presente estudo foi desenhado para avaliar o hipocampo de crianças e adolescentes para obter uma análise quantitativa de: (1) percentagem de perda de neurônios; (2) quantidade de brotamento de fibras musgosas glutamatérgicas supragranular; (3) densidade de subunidade AMPA GluR1 na camada molecular interna da fásia denteada (FD); (4) densidade de hiperinervação supragranular de axônios gabaérgicos; e (5) densidade de receptor GABA-A $\beta$  na camada molecular interna da FD. Esses dados podem melhorar nosso entendimento se a anatomia química do hipocampo na EH aumenta com a idade e o quanto os sistemas de transmissão hipocampal são significativamente diferentes entre pacientes com EH e sem EH.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Pacientes com crises epiléticas refratárias foram rotineiramente avaliados no "Comprehensive Epilepsy Program" na "The Cleveland Clinic Foundation" com protocolos de diagnóstico pré-operatório para cirurgia da epilepsia previamente publicados em detalhes (Morris, 1992). Um total de 22 hipocampos foram utilizados nesse estudo, provenientes de uma série consecutiva coletada de janeiro de 1996 a fevereiro de 1998. A idade dos pacientes variou de 1 a 18 anos (média de 9,2 anos). Baseados em dados clínicos e de neuroimagem, os pacientes foram catalogados em duas categorias: (1) sem esclerose hipocampal (n=11), que incluía anormalidades como megalencefalia (1 paciente), displasia cortical (2 pacientes), hemorragia da



matriz germinal (1 paciente), tumores (3 pacientes), infarto de artérias cerebrais pré-natal (1 paciente), esclerose tuberosa (1 paciente), hamartoma (1 paciente), ou patologias adquiridas pós-natal como síndrome de Rasmussen (1 caso); (2) esclerose hipocampal (n=11) quando clinicamente existiam características de epilepsia mesial temporal e a neuroimagem e patologia eram compatíveis com esse diagnóstico.

#### Preparação do tecido

O hipocampo ressecado durante cirurgia para tratamento de epilepsia do lobo temporal era recebido fresco da sala cirúrgica. Dois blocos adjacentes de 3 mm de espessura eram cortados no plano coronal e colocado em diferentes fixativos. Para imuno-histoquímica (ICC), um bloco era fixo em um volume de 100 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) (PB) por dois dias. Após a fixação, o bloco era crioprotégido em PB com sucrose a 20% em pernoite, congelado em gelo seco e seccionado em criostato. Para técnica de Timm, um segundo bloco era colocado em 100 ml de: sulfato de sódio 0,1% / glutaraldeído 4% em 0,12M de tampão de Millonig (MB), pH 7,3 com 0,0002% de cloreto de cálcio e armazenado a 4 graus centígrados por 2-3 dias. Os blocos do Timm eram então transferidos para um pernoite em MB com 20% de sucrose e após congelados e seccionados em criostato.

#### Imuno-histoquímica (ICC)

Três anticorpos foram utilizados nesse estudo: anticorpo policlonal GluR1 (1:50, de coelho, Chemicon); anticorpo monoclonal GABA-A $\beta$  (1:50, de camundongo, Boheringer Mannheim), e glutamato descarboxilase (GAD, 1:6000, de ovelha, Oertel et al., 1981). Os protocolos de imuno-histoquímica foram similares aos procedimentos previamente descritos (Babb et al., 1989; Ying et al., 1998).

Blocos foram seccionados em criostato com espessura de 30 $\mu$ m e o tecido colocado em espaços individuais de 3ml, em placas de cultura de tecido, contendo 0,05M Tris de solução salina (TBS, pH 7,6). Os cortes eram processados livres e lavados em TBS entre cada etapa ao longo do procedimento: 1) 5 minutos em 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10% metanol em TBS; 2) 60 minutos em soro normal a 1,5% para bloqueio; 3)

18 horas de pernoite em temperatura ambiente no anticorpo primário diluído em TBS contendo 1% de soro normal; 4) 35 minutos em anticorpo secundário biotinizado específico (ABC kit, laboratórios Vector). Para visualizar o complexo reativo, o tecido era colocado 8 minutos em 0,05% 3,3'- diaminobenzidina (DAB) em 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em TBS em pratos de Petri. A reação era terminada através de várias lavadas em TBS frio. O tecido era então montado em lâminas com banho de gelatina, seco ao ar livre por várias horas e então coberto com lamínula. Experimentos controle foram feitos por omissão do anticorpo primário usando o mesmo protocolo de coloração: nenhuma coloração específica foi visualizada na ausência de anticorpo primário.

#### Histoquímica de Neo-Timm

A coloração específica com zinco para visualizar fibras musgosas (axônios das células granulares) foi realizada através da técnica de Neo-Timm. Os cortes com 30µm, adjacentes aqueles usados para ICC, eram montados em lâmina, seco ao ar livre e imersos em um "revelador físico" a 26°C em uma câmara escura. O revelador consistia de 180 ml de solução de goma arábica a 50%, 30ml de uma solução aquosa de 7,56g de ácido cítrico e 7,05g citrato de sódio, 90ml de uma solução aquosa de 5,3g de hidroquinona e 1,5ml de solução de nitrato de prata 17%. Dois tempos diferentes de revelação para permitir um padrão idêntico foram utilizados para confirmar que a coloração era específica para fibras musgosas: o tempo de revelação para cortes levemente corados foi 45 minutos e 55 min. Para fortemente corados, foi baseado na inspeção visual na sala escura com uma pequena lâmpada. As lâminas eram então removidas do revelador e lavadas em água destilada por 10 min e posteriormente em água corrente por 10 minutos para bloquear a reação. Os cortes eram então secos à temperatura ambiente, desidratados em álcool e cobertos com lamínula.

#### Análise dos Dados

##### Contagem celular

Todos os hipocampos foram processados com Cresyl-violeta para contagem de



células (com espessura de  $10\mu\text{m}$ ) em aumento de 400x, usando técnicas morfométricas com grade (Babb et al., 1984 a, b). A porcentagem de perda celular no corno de Ammon, comparada a controles de autópsia, era obtidos através da média da perda celular nas diferentes áreas do corno de Ammon (CA1, CA2, CA3 e CA4). As células granulares da fásia denteada (FD) eram também contadas e comparadas com controle de autópsia.

#### Avaliação visual do brotamento na camada molecular pela coloração de Neo-Timm.

Dois observadores experientes (YZ e TB), independentemente e “cegos”, classificaram o padrão visual de terminais de fibras musgosas (FMT) na camada molecular interna (IML) usando uma escala ordinal, variando de zero (nenhum) até 3 (maior), como descrito e ilustrado na Figura 2. Os escores podiam ser modificados com variações de 0,5 se o padrão parecia um pouco mais ou menos que exemplos ilustrados na figura 2. Foi feita média dos dois escores em um valor ordinal final para IML MTF.

#### Densitometria Quantitativa da Imunorreatividade para GluR1, GAD e GABA-A $\beta$ .

As densidades de cinza (variando de branco a preto) na camada molecular interna (IML) do hipocampo foram analisadas utilizando densitometria computadorizada. As imagens foram captadas utilizando uma câmara monocromática (Hamamatsu) acoplada a um microscópio Leitz. As imagens eram então digitalizadas em um computador Macintosh e analisadas usando um software de imagem (NIH image, versão 1.58). A IML era selecionada no computador usando um cursor digital, e a média dos valores de cinza (escala de 0-255) de todos os pontos dentro da área eram automaticamente calculados. Todos os valores de cinza de imunorreatividade para GluR1, GAD e GABA-A $\beta$  foram inseridos em um programa de banco de dados (Excel). Devido a severa perda de células granulares em hipocampos escleróticos, foi impossível relacionar diretamente os valores da densitometria com a densidade de

receptores dendríticos para GluR1 e GABA-A $\beta$  ou densidade axonal de GAD. Entretanto, foi possível estimar a densidade dendrítica de cada hipocampo através da correção para perdas na camada granular (GC). Dessa forma, os valores de cinza para os três anticorpos foram divididos pela densidade das células granulares determinada por contagem celular. Esse procedimento nos permitiu uma estimativa da densidade dendrítica. Através de análise de regressão, os escores de Timm de cada paciente e os valores de cinza (divididos pela densidade de GC) foram plotados contra idade dos pacientes utilizando o programa DeltaGraph Professional (DeltaPoint, Monterey, CA), e considerados significativamente diferentes com um nível de confiança de  $p < 0,05$ . Para comparar as diferenças na densidade do Timm e perda celular em diferentes áreas do CA entre pacientes com esclerose hipocampal e sem EH, o teste de Student foi usado para detectar diferenças significativas.

## **RESULTADOS**

### Perda celular no Hipocampo

Para determinar se a perda celular hipocampal estava correlacionada com aumento de idade em crianças e adolescentes com crises recorrentes, a média de perda celular no corno de Ammon foi comparada a idade do paciente em uma análise de regressão linear independente da etiologia da crise, e os resultados são mostrados na Fig. 1A. A porcentagem de perda celular no corno de Ammon (CA) foi positivamente relacionada com a idade do paciente ( $R^2=0,308$ ;  $p=0,019$ ). Dessa forma, quanto mais idade tinha o paciente, maior era a perda neuronal no hipocampo. Uma análise linear semelhante foi então realizada separadamente nos pacientes com e sem EH. No grupo non-EH (Fig. 1B), a média da perda celular no CA mostrou uma tendência de correlação com a idade ( $p=0,069$ ), o que indica que nesses pacientes pode existir uma perda progressiva ao longo dos anos. Nos pacientes com EH (Fig. 1C) não encontramos essa correlação ( $p=0,598$ ), indicando que a perda celular no hipocampo desses pacientes foi estática ao longo dos anos. Entretanto, é importante ressaltar que o paciente mais novo nesse grupo tinha 6 anos.



Dentro de cada grupo de pacientes, a média da perda celular em CA1, CA4 e FD foi comparado (Fig.1D). Em pacientes com esclerose hipocampal, a região CA1 teve a maior perda celular se comparada a CA4 e FD,  $p=0,0015$  e  $0,0008$  respectivamente. Entretanto, a perda celular em CA4 e FD não foi significativamente diferente ( $p=0,82$ ). No grupo non-EH, as áreas CA1 e FD apresentaram maior perda celular que CA4 ( $p=0,03$  e  $0,0023$  respectivamente). Entretanto, a perda celular em CA1 e FD não foi significativamente diferente ( $p=0,73$ ). Em ambos os grupos CA1, o bem conhecido setor de Sommer, apresentou maiores perdas celulares.

A Figura 1E demonstra a média de perda celular nos campos CA1, CA4 e a perda de células granulares na FD para comparar os dois grupos. No grupo EH, as perdas celulares em CA1 e CA4 são significativamente maiores comparadas com grupo non-EH ( $p=0,0002$  e  $0,0069$  respectivamente). A perda celular na fásia denteada não mostrou diferenças significativas entre os dois grupos ( $p=0,98$ ).

Para determinar se a perda celular no hipocampo estava relacionada com a duração ou início das crises, a média de perda celular no corno de Ammon foi comparada com duração e início das crises em uma análise de regressão linear separadamente nos dois grupos. No grupo non-EH, houve uma tendência de correlação positiva com duração das crises em anos ( $p=0,088$ ,  $n=9$ ), mas não esteve relacionado com a idade de início das crises ( $p=0,58$ ). Nos pacientes com EH, o grau de perda celular não esteve correlacionada a nenhuma das variáveis ( $p=0,967$  e  $0,68$ , respectivamente). Portanto, a perda celular no hipocampo aumenta com períodos maiores de crises apenas nos pacientes sem EH, e a perda celular não esteve correlacionada com o início das crises.

#### Brotamento de Fibras Musgosas Supragranular

A Fig.2 ilustra as principais características das células granulares (A, C e E) e sua inervação pelas fibras musgosas (B, D e F) na fásia denteada. Fig. 2 A e 2B são exemplos de FD virtualmente não esclerótica: a camada de células granulares é altamente compacta com bordas distintas (A) e existem poucas fibras musgosas

coradas pelo Timm na camada molecular interna (B). Ao contrário, as figuras 2E e 2F são típicos exemplos de FD severamente esclerótica: a camada granular tem bordas pobremente definidas devido a severa perda de células granulares (E) e as fibras musgosas apresentam um brotamento axonal para a IML, formando bandas escuras (F). Figuras 2C e 2D são exemplos de formas menos severas de EH. A camada granular é dispersa e menos compacta que no hipocampo não esclerótico, mostrado na Fig. 2A. O brotamento axonal para IML é evidente (Fig.1D) mas é menos denso comparado a severa EH mostrado na Fig.1F.

Para determinar se a neoinervação de fibras musgosas estava relacionado com idade de crianças e adolescentes, a densidade das fibras musgosas, determinada por uma escala ordinal, foi comparada com a idade do paciente (EH e non-EH) em uma análise de regressão linear, independente da etiologia das crises. A Fig. 3A mostra que o brotamento axonal foi positivamente correlacionado com a idade do paciente ( $R^2=0,346$ ;  $p<0,0032$ ). Portanto, quanto maior a idade do paciente, maior o brotamento axonal de fibras musgosas na camada molecular interna. Uma análise similar, separada para cada grupo, mostrou correlação positiva entre idade e IML FMs. No grupo non-EH, a correlação foi a um nível de confiança de apenas  $p=0,08$ , o que é uma forte tendência linear dado o pequeno número de pacientes ( $n=11$ ). Similarmente, no grupo EH também houve uma tendência de correlação positiva ( $n=10$ ).

A Fig. 3D ilustra as diferenças de densidades dos terminais de fibras musgosas na IML para pacientes EH e non-EH. As densidades das fibras musgosas foram significativamente maiores no grupo EH ( $p=0,046$ ).

Para determinar em qual área a perda celular esteve relacionada ao brotamento axonal de fibras musgosas supragranular, os escores de Timm foram comparados a perda celular nos campos CA1, CA4 e FD usando uma análise de regressão linear em ambos os grupos. O brotamento axonal supragranular de fibras musgosas esteve significativamente relacionado apenas a perda celular na FD em pacientes com EH (Fig.3E,  $p=0,016$ ).



Para determinar se a neoinervação supragranular de fibras musgosas estava relacionada com duração ou idade de início das crises, a densidade de fibras musgosas, determinada por uma escala ordinal visual, foi comparada com duração das crises ou a idade de início da epilepsia em uma análise de regressão linear nos dois grupos separadamente. No grupo sem EH, o brotamento axonal de fibras musgosas mostrou uma tendência de correlação com a duração das crises em anos ( $p=0,077$ ), mas não esteve correlacionado com a idade de início ( $p=0,62$ ). Em pacientes com EH, não houve correlação com nenhuma das variáveis. Portanto, a neoinervação supragranular pelas fibras musgosas foi maior com períodos mais longos de crise apenas no grupo sem EH.

#### Aumento de Receptores AMPA GluR1 na Fásia Denteada.

A Figura 4 mostra o padrão de densidade dos receptores AMPA GluR1-ICC (Fig.4C, D) em relação a inervação de fibras musgosas (Timm, Fig.4A, B) na fásia denteada não esclerótica (A, C) e esclerótica (B, D). Na FD não esclerótica, existe pequeno brotamento de fibras musgosas para IML (A) e coloração relativamente fraca com GluR1 na camada molecular e nos corpos das células granulares (C). Em contraste, a FD esclerótica mostra fibras musgosas aberrantes coradas pelo Timm (B: IML apenas) e maior coloração com GluR1 através da extensão da camada molecular e corpos das células granulares (D). É importante notar que o aumento de GluR1 não esteve limitado a camada molecular interna onde as fibras musgosas têm inervação aberrante, mas esteve aumentada em toda a extensão da zona dendrítica. Existe uma tendência para maior densidade de GluR1 na camada molecular interna quanto maior a idade do paciente; entretanto, não foi estatisticamente significativa.

#### Brotamento Axonal GABAérgico e aumento de Receptores GABA-A $\beta$ na Fásia Denteada

A Figura 5 ilustra exemplos típicos de coloração de densidade axonal pelo GAD (C, D) e densidades de receptores GABA-A $\beta$  (E, F) em relação aos padrões adjacentes de inervação das fibras musgosas (FM) (A, B) na fásia denteada de um

hipocampo não esclerótico (A, C, E) e de um hipocampo esclerótico (B, D e F). Os padrões do brotamento axonal supragranular das fibras musgosas em pacientes sem EH (A) e com EH (B) são similares àqueles demonstrados na Figura 4. No hipocampo não esclerótico, os terminais axonais imunorreativos ao GAD são menos densos na IML e delineiam uma banda relativamente vazia (C). A imunorreatividade ao GAD foi sempre maior na IML em hipocampos escleróticos (D), formando uma banda escura na IML. As densidades de receptores GABA-A $\beta$  foram uniformemente distribuídas através de toda a camada molecular tanto em hipocampos não escleróticos (E) como em hipocampos escleróticos (F). Entretanto, a densidade foi maior em hipocampos escleróticos em toda a camada molecular. Esse é um outro exemplo, assim como GluR1 (Fig. 4D) em que o aumento de receptores ou densidade aumentada ocorre em toda a extensão da camada dendrítica e não fica limitada a zona de hiperinervação na IML.

A imunorreatividade ao GAD e ao GABA-A $\beta$  na IML foram comparadas a idade dos pacientes em uma análise de regressão linear independente da etiologia das crises. Os resultados são mostrados na Fig. 6A e 6B. As densidades de GAD e GABA-A $\beta$  tendem a aumentar com a idade. Entretanto, a correlação positiva não foi estatisticamente significativa com apenas 9 e 10 pacientes em cada análise ( $p=0,08$  e  $p=0,06$  respectivamente), o que representa uma forte tendência.

Para determinar se as imunorreatividades ao GAD e GABA-A $\beta$  na IML estavam relacionadas a perda celular nas diferentes zonas do hipocampo, as densidades foram comparadas com as perdas celulares em CA1 e em CA4. As densidades de GABA-A $\beta$  estiveram significativamente relacionadas com maior perda celular em CA4 (Fig. 6D,  $p=0,02$ ), mas não se correlacionaram com perdas celulares em CA1 (dados não mostrados). As densidades de GAD tenderam a correlacionar com perdas celulares em CA4 (Fig. 6C,  $p=0,09$ ); entretanto, a correlação não foi estatisticamente significativa com apenas 9 pacientes.



## DISCUSSÃO

### Perdas Neuronais

Os resultados desse estudo demonstram importantes achados em relação ao quanto a epilepsia na infância está associada a perda neuronal e brotamento de fibras musgosas supragranular no hipocampo. Especificamente, tanto em pacientes com EH como em non-EH, nós encontramos que CA1 tinha maior perda celular que CA4. Esse padrão de perda celular é similar aos achados prévios em pacientes adultos com epilepsia hipocampal (Babb et al., 1984 a, b; 1991; Mathern et al., 1995d). As perdas neuronais tanto em CA1 como em CA4 são maiores em pacientes com EH se comparados aos sem EH. Da mesma forma, o brotamento de fibras musgosas supragranular foi maior nos pacientes com EH. Esses resultados fortemente indicam que, independente da etiologia das crises, a epilepsia na infância está associada a perda neuronal e inervação aberrante de fibras musgosas supragranular. Entretanto, o hipocampo parece ser menos patológico em pacientes sem EH.

O hipocampo de crianças com epilepsia secundária a lesões extra-hipocampais congênitas ou adquiridas (pacientes sem EH) mostram que quanto maior a idade, existe maior perda celular no corno de Ammon e maior brotamento axonal de fibras musgosas supragranular na camada molecular interna (IML). De maior importância nesse grupo de pacientes, a porcentagem de perda celular e de brotamento axonal tende a ser correlacionado com duração das crises ( $p=0,088$  e  $0,077$  respectivamente), mas não esteve relacionado com a idade de início das crises. É importante considerar que em nosso estudo o número de pacientes é pequeno e esses valores de  $p$  poderiam ser aumentados a um nível significativo se uma amostra maior fosse estudada. Em contraste, em pacientes com EH essas variáveis (perda celular e brotamento de fibras musgosas) não foram associadas com duração ou idade de início das crises. Baseado nos nossos achados, as seguintes conclusões podem ser feitas: (1) nos pacientes com EH, a perda neuronal e o brotamento axonal foram estáticos e não progressivos com períodos maiores de crises; (2) em crianças com

epilepsia e lesões extra-hipocampais congênitas ou adquiridas, a perda neuronal e o brotamento axonal aumentam progressivamente quanto maior a duração da epilepsia.

Existem duas possíveis explicações para a associação entre perda celular hipocampal e duração da epilepsia. Primeiro, comparado com pacientes com EH, os pacientes sem EH iniciaram suas crises mais cedo. É possível que um cérebro mais imaturo, especialmente durante certos períodos do desenvolvimento, seja mais vulnerável aos danos causados pelas crises. Conseqüentemente, um cérebro imaturo pode ter perda neuronal em cada episódio de crise. É importante mencionar que a frequência das crises pode também ter um importante papel como causa de morte celular, aumentando a perda neuronal. Entretanto, as dificuldades de obter uma história confiável sobre a frequência de crises em crianças torna esse dado de pouca utilidade. Muitos estudos em adultos com epilepsia mesial temporal mostraram a associação entre diminuição da densidade neuronal em CA1 com a história de crises (Mouritzen-Dam, 1980; Mathern et al., 1995c, d). Nossos dados, estudando epilepsia na infância, não confirmaram essa correlação. Isso pode dever-se ao fato de a história de epilepsia ser mais curta nessa população. Além disso, o número de pacientes é pequeno e a percentagem de perda celular em CA1 ficou concentrada entre 80 e 90%, o que pode ter tornado a correlação não significativa.

#### Brotamento de fibras musgosas (FM)

A observação de que um maior brotamento axonal está associado com maior duração das crises em pacientes sem EH é bastante interessante. Esse fato levanta a possibilidade de que crises repetitivas em um período de desenvolvimento precoce seja suficiente para desencadear brotamento progressivo de FM. A segunda possibilidade é que um brotamento de FM progressivo é induzido pelo dano hipocampal associado. Nossos dados indicam que o hipocampo, durante um certo período de desenvolvimento, é capaz de se remodelar na vigência de epilepsia, pois não houve correlação entre o brotamento de FM e a perda celular em CA1, CA4 e fásia denteada. Essa noção está de acordo com os conceitos anteriores sugeridos



por Mathern et al. (1995a) de que se uma criança apresenta crises associadas com dano extra-hipocampal congênito ou adquirido, então poderá existir uma evolução progressiva da reorganização sináptica com brotamento de fibras musgosas supragranular que eventualmente evolui para severa esclerose hipocampal e gera crises independentes. Em comparação, em pacientes com EH, o brotamento supragranular de fibras musgosas esteve correlacionado com o dano neuronal na fásia denteada, mas não foi correlacionado com a duração das crises ou o início das crises. Essas observações sugerem que a reorganização sináptica das fibras musgosas nos pacientes com EH é o resultado de deaferentação dos dendritos das células granulares causado por morte de células neuronais no hilo. Desde que é impossível quantificar a perda de células hilares, então a patologia das células granulares pode ser uma estimativa bastante aproximada da complexa população de neurônios hilares.

#### Excitação e Inibição

Os terminais das fibras musgosas reorganizadas formam sinapses assimétricas em dendritos da camada molecular interna (Babb et al. 1991), sugerindo que esses terminais de fibras musgosas são sinapses funcionais que secretam glutamato. Nesse estudo nós demonstramos que na epilepsia da infância as densidades de GluR1 pós-sináptico estão modificadas. Independente da etiologia da epilepsia, as proteínas da subunidade GluR1 estiveram aumentadas ao longo da camada molecular no hipocampo esclerótico, se comparado com hipocampo não esclerótico ou levemente esclerótico. Isso indica que os dendritos das células granulares podem ser hiperexcitáveis para todos os tipos de descargas glutamatérgicas que chegam ao hipocampo, incluindo a via perfurante que inerva a camada molecular externa e as fibras musgosas sinapticamente reorganizadas que inervam a camada molecular interna. Essas observações estão de acordo com achados anteriores em populações de pacientes adultos (Babb et al., 1996; Lynd Balta et al., 1996; Ying et al., 1998; Mathern et al., 1998 a, b).

Historicamente, uma redução da inibição era considerada a explicação mais parcimoniosa para a hiperexcitabilidade hipocampal porque o hipocampo possui vias inibitórias divergentes e poderosas (Spencer e Kandel, 1961), e foi proposto que deveria existir redução de neurônios GABAérgicos no hipocampo epiléptico. Entretanto, tanto na epilepsia em humanos como em animais, os neurônios GABA são relativamente poupados (Babb et al., 1989; Davenport et al., 1990a). Posteriormente, estudos em epilepsia hipocampal em adultos e modelos animais demonstraram que axônios GABAérgicos estavam “brotados” para dentro da fásia denteada em hipocampos epilépticos (Mathern et al., 1995b; Davenport et al., 1990b). Nesse estudo, nós utilizamos imuno-histoquímica para corar axônios GABA e proteínas da subunidade beta de receptores pós-sinápticos GABA-A no hipocampo de crianças com epilepsia. Em hipocampos escleróticos, os axônios GABA brotaram e reinervaram dendritos na camada molecular interna, de forma similar ao que ocorre com as fibras musgosas. As proteínas GABA-A $\beta$  dos receptores pós-sinápticos estiveram aumentadas ao longo de toda a extensão da camada molecular da fásia denteada quando comparada com hipocampos não escleróticos. Dessa forma, fica claro que o hipocampo de crianças com epilepsia o sistema inibitório GABAérgico está aumentado. Estudos eletrofisiológicos em cortes de cérebro confirmam a noção de que o sistema inibitório está preservado e aumentado no hipocampo epiléptico (Williamson et al., 1995). A hiperinervação GABA pode compensar uma excitação recorrente simultânea na mesma célula granular, o que pode resultar em crises contínuas. A hiperinervação GABA pode também sincronizar os potenciais de membrana de várias células granulares e dessa forma aumentar o número de células disparando diante do próxima descarga acima do limiar.