

ARIÁDNE SANCHES GONÇALVES

**CORRELAÇÃO ENTRE IMAGEM DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E
IMAGEM POR MICROSCOPIA DE HIPOCAMPOS DE PACIENTES
COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL COM ESCLEROSE
DE HIPOCAMPO**

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Federal de São Paulo –
Escola Paulista de Medicina para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2010

ARIÁDNE SANCHES GONÇALVES

**CORRELAÇÃO ENTRE IMAGEM DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E
IMAGEM POR MICROSCOPIA DE HIPOCAMPOS DE PACIENTES
COM EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL COM ESCLEROSE
DE HIPOCAMPO**

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Federal de São Paulo –
Escola Paulista de Medicina para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alexandre Valotta da Silva

CO-ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Lea Tenenholz Grinberg

SÃO PAULO

2010

Financiamento: CAPES, CInAPCe - FAPESP, CNPq.

Gonçalves, A. S.

Correlação entre imagem de ressonância magnética e imagem por microscopia de hipocampos de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose de hipocampo / Ariádne Sanches Gonçalves – São Paulo 2010. 89f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Neurologia e Neurocirurgia. Disciplina de Neurologia Experimental.
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Valotta da Silva

Correlation between magnetic resonance and microscopy imaging in sclerotic hippocampi from mesial temporal lobe epileptic patients.

1- Hipocampo, 2- RM, 3- microscopia,
4- co-registro, 5- ELTM

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA E NEUROCIRURGIA

Chefe de Departamento:

Prof^a. Dr^a. Débora Amado Scerni

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Naffah-Mazzacoratti

ARIÁDNE SANCHES GONÇALVES

**CORRELAÇÃO ENTRE IMAGEM DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E
IMAGEM POR MICROSCOPIA DE HIPOCAMPOS DE PACIENTES COM
EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL COM ESCLEROSE DE
HIPOCAMPO**

PRESIDENTE DA BANCA

Prof. Dr. Alexandre Valotta da Silva

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Amaro Junior

Prof Dr. Fernando Cendes

Prof Dr. Henrique Carrete Junior

SUPLENTE

Profª Drª Isabel Cristina Céspedes

Aprovada em: / /

Esta dissertação foi realizada no Departamento de Neurologia e Neurocirurgia e no Departamento de Biociências da UNIFESP e no Departamento de Patologia, GEROLAB e LIM 22 da FMUSP, durante o curso de Pós-Graduação em Neurologia - Neurociências. Auxílio financeiro: CAPES, CInAPCe - FAPESP e CNPq. Ariadne Sanches Gonçalves foi bolsista da CAPES.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Luiz Carlos** e **Valterli** pelo apoio e dedicação incondicional em todos os momentos desta caminhada.

Meus irmãos **Luiz Felipe** e **Rafael Vicente** pelo apoio, por me agüentarem nos momentos de “stress”, que foram muitos, me distraíndo e acalmando com suas melodias e palavras.

A **Tias Dete** e **Naia** e a minha **Tia-avó Terezinha** pelas orações, pois elas me ajudaram a superar os obstáculos e a ter paciência e calma para resolvê-los da melhor maneira possível.

A minha avó **Julia** , onde estiver sei que esta torcendo por mim. Vó te amo.

Ao meu padrinho querido **Fernando (Gordinho)**, que em vida sempre me apoiou, que nas horas duvidas não permitiu que eu abandonasse meus sonhos e me seguir a trilha em rumo a vitória. **Dinho** estará sempre em meu coração e sei que onde estiver esta vibrando pela nossa conquista. Muito obrigada por fazer parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por iluminar e abençoar essa caminhada

Ao meu orientador Prof. Dr. **Alexandre Valotta da Silva** por me receber em seu laboratório, pela dedicação e por fornecer precioso conhecimento para a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora Prof^a Dr^a **Lea Tenenholz Grinberg** por me acolher em seu laboratório e me guiar pacientemente com suas sugestões e palavras sábias durante a realização deste trabalho, mesmo estando longe se fez sempre presente.

Aos alunos de iniciação científica **Daniel, Mateus, Isabela, Eduardo e Pâmela**, pela ajuda, companhia e tudo mais, muito obrigada meninos.

Aos meus amigos **Márcia, Isabel, Jaqueline, Denis, Fernando (Sasquat), Reinaldo (Rei), Maurício e Luciana** por serem companheiros de pesquisas, de descidas e subidas de serra, de madrugadas, de diversão e atenção. Muito obrigada por estarem comigo nessa caminhada nas alegrias e nas angustias, em suma em todos os momentos, vocês sempre estarão guardados em minhas memórias e em minha vida.

A todos os meus companheiros de laboratório NEXP a **Carolina, Luciana, Aline, Eliza, Laila, Carla, Diego, Mauricio, Henrique, Bruno, Erika, Andre Luiz e Leandro**, pelo convívio e pela ajuda dada sempre que precisava.

A todos os integrantes do **Grupo de Estudo de Envelhecimento Cerebral** da FMUSP pela atenção, ajuda e colaboração com este trabalho.

A **Marta Crocci** pelo apoio e amizade dedica desde a época de iniciação científica.

Aos Técnicos de Imagem **Luiz e Claudio**, do Departamento de Diagnóstico por Imagem (DDI) – Unifesp, por toda a atenção e ajuda prestada, o meu muito obrigada.

A equipe de pesquisa do **Instituto de Radiologia do HC**, especialmente ao **Dr. João Ricardo Sato** pela paciência, palavras de animo e sabedoria que muito ajudaram nessa caminhada.

Aos funcionários do Laboratório de Neurologia experimental da Unifesp **Edvaldo, Luiz e Dona Hilda** pela grande ajuda e experiência oferecida.

A todos os professores, técnico e demais funcionários da Unifesp – Campi Baixada Santista, que de alguma maneira participaram da execução deste trabalho.

A CAPES, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro concedido.

Agradeço também a todos que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**"Sou eu, eu mesmo, tal qual resultei de tudo,
Espécie de acessório ou sobressalente próprio,
Arredores irregulares da minha emoção sincera,
Sou eu aqui em mim, sou eu.**

Quanto fui, quanto não fui, tudo isso sou.

Quanto quis, quanto não quis, tudo isso me forma.

Quanto amei ou deixei de amar é a mesma saudade em mim. (...)"

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	VI
AGRADECIMENTOS	VII
SUMÁRIO	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL	1
1.2. FORMAÇÃO HIPOCAMPAL	4
1.2.1. <i>Citoarquitetura</i>	7
1.3. IMAGEM POR MICROSCOPIA E ESCLEROSE HIPOCAMPAL	12
1.4. IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E ESCLEROSE HIPOCAMPAL.....	14
1.5. CORRELAÇÃO ENTRE IMAGEM POR RM E ACHADOS MICROSCÓPICOS.....	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	18
3.1 SUJEITOS CONTROLE	18
3.2 PACIENTES COM ELTM	20
3.3 MANUSEIO E FIXAÇÃO DO TECIDO.....	21
3.3.1 <i>Hipocampos controles</i>	21
3.3.2 <i>Hipocampos escleróticos</i>	21
3.4 EXAME DE RM	22
3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA	22
3.5.1. <i>Coloração de Nissl por Violeta de Cresila</i>	23
3.6 CORRELAÇÃO ENTRE IMAGENS RM E HISTOLOGIA	24
3.7 COMITÊ DE ÉTICA	25
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: DADOS CLÍNICOS DOS SUJEITOS CONTROLE.....	19
TABELA 2: DADOS CLINICOS DOS PACIENTES COM ELTM	20
TABELA 3: NÚMEROS DE FATIAS HISTOLÓGICAS INTERPOLADAS APÓS O CO-REGISTRO	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ANATOMIA MACROSCÓPICA HIPOCAMPO	6
FIGURA 2: CLASSIFICAÇÃO DA CITOARQUITETURA DO HIPOCAMPO SEGUNDO LORENTE DE NÓ.....	11
FIGURA 3: COMPRAÇÃO ENTRE IMAGENSN 3D CEREBRO INTEIRO E HIPOCAMPO CONTROLE	27
FIGURA 4: COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE AQUISIÇÃO DE IMAGEM HISTOLÓGICA.....	28
FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DE AQUISIÇÃO DE IMAGEM HISTOLÓGICA E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA.	30
FIGURA 6: CORRELAÇÃO ENTRE IMAGENS DE RM EX VIVO E DE HISTOLOGIA EM HIPOCAMPOS CONTROLE	31
FIGURA 7: CORRELAÇÃO ENTRE IMAGENS DE RM E DE HISTOLOGIA EM HIPOCAMPOS ESCLERÓTICOS.....	32
FIGURA 8: MODELOS 3D DE HIPOCAMPOS E PONTO DE REFERÊNCIAS...33	33
FIGURA 9: INTERPOLAÇÃO DAS IMAGENS HISTOLÓGICAS	35

**FIGURA 10: DEMONSTRAÇÃO DO RESULTADO DA SEQÜÊNCIA DE
INTERPOLAÇÃO HISTOLÓGICA..... 36**

LISTA DE ABREVIATURAS

(a)	anos
ABC	Avidina-biotina peroxidase
BEHGEEC	Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudo de Envelhecimento Cerebral
CA	Corno de Ammon
CA1	Região 1 do Corno de Ammon
CA2	Região 2 do Corno de Ammon
CA3	Região 3 do Corno de Ammon
CA4	Região 4 do Corno de Ammon
CAPPesq.	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cm	centímetros
col	colaboradores
CPC	Crise Parcial Complexa
CTRL	Controle

DAB	Diaminobenzidina
DAE	droga antiepiléptica
DM	Diabetes mellitus
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
E	Esquerdo
EAP	Edema agudo pulmonar
EEG	Eletroencefalograma
EH	Esclerose hipocampal
ELT	Epilepsia do lobo temporal
ELTM	Epilepsia do lobo temporal mesial
EMT	Esclerose mesial temporal
Ent	Córtex entorrinal
et al	e colaboradores
FD	<i>fascia dentata</i>
Fem	Feminino
FH	formação hipocampal
Fig	Figura

FLAIR	Seqüência ponderada em T2 por atenuação de liquido e tempo de inversão e recuperação
FOV	campo de visão
GD	giro dentado
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GPH	giro parahipocampal
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	hospital das clínicas faculdade de medicina da universidade de São Paulo
HCl	ácido clorídrico
H ₂ O	água
H ₂ O _d	água destilada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IgG	imunoglobulina G
img	imagem

IPI	insulto precipitante inicial
IR	seqüência ponderada em tempo de inversão-recuperação
Loc	localizador
M	molar
Masc	Masculino
mm	milímetros
ms	milissegundo
N	número de aquisições
NeuN	Antígeno nuclear neuronal
NEXP	Neurologia experimental
PB	tampão fosfato
PBS	tampão fosfato salina
Pct	Paciente
PFa	Paraformaldeído
pH	Potencial hidrogeniônico
RM	ressonância magnética
RNA	ácido ribonucléico

SL	espessura do corte
SNC	sistema nervoso central
SPECT	tomografia por emissão de fóton único
SVOC	serviço de verificação de óbito da capital
Tab	tabela
TC	tomografia computadorizada
TE	tempo de eco
TI	tempo de inversão
TR	tempo de relaxação ou relaxamento
T1	seqüência ponderada em T1w
T2	seqüência ponderada em T2w
USP	Universidade de São Paulo
VIM	vimentina
µm	micrometro
1,5T	um e meio tesla
2D	duas dimensões
3D	três dimensões

RESUMO

A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) é a forma mais freqüente de epilepsia focal refratária ao tratamento farmacológico em adultos. O achado anatomopatológico mais comum é a esclerose hipocampal (EH), caracterizada por perda neuronal e gliose, especialmente no setor de Sommer (CA1 e *prosubiculum*) e na região hilar (CA4), com relativa preservação de CA2, *subiculum* e camada granular do GD. O diagnóstico da EH pela RM se traduz por diminuição do volume e/ou aumento do sinal hipocampal nas seqüências ponderadas em T2 ou na seqüência FLAIR, podendo ser acompanhados de modificação no formato e na estrutura interna do hipocampo. Este trabalho pretende realizar o co-registro de imagens obtidas por ressonância magnética e os achados histopatológicos de hipocampos escleróticos de pacientes com ELTM. Foram utilizados hipocampos de pacientes com ELTM submetidos a cirurgia e indivíduos necropsiados (controles). Em um primeiro momento os hipocampos controle foram utilizados na adequação técnica do protocolo, que em seguida foi aplicado aos casos de ELTM. Foram obtidas imagens histológicas e de RM e gerados volumes 3D. O co-registro desses volumes foi obtido utilizando pontos de referência (“landmarks”). A quantidade de pontos de referência nos controles foi em média 16 (dezesesseis) e nos hipocampos escleróticos foram feitos testes com 9, 16 e 32 pontos. Baseados nesses resultados foi possível determinar coordenadas espaciais comuns às imagens de microscopia e de RM, a fim de permitir correlações ponto-à-ponto. Com relação aos hipocampos escleróticos, obtivemos resultados satisfatórios, porém com uma qualidade inferior em relação aos controles.

ABSTRACT

The mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is the most frequent form of refractory epilepsy in adults. The most common pathological finding is the hippocampal sclerosis (HS), characterized by neuronal loss and gliosis, especially in the Sommer sector (CA1 and *prosubiculum*) and the hilar region (CA4), with relative preservation of CA2, *subicullum* and granular layer of DG. The diagnosis of HS by MRI is characterized by an increased volume and/or decreased hippocampal signal on T2 weighted or FLAIR sequence, and may be accompanied by changes in shape and internal structure of the hippocampus. This work aims to achieve the co-registration of images obtained by magnetic resonance and histopathological findings in sclerotic hippocampi of MTLE patients. We used hippocampi of MTLE patients subjected to surgery and necropsy cases (controls). Firstly, control hippocampi were used for technical adjustments of the protocol, which was then applied to MTLE cases. 3D volumes were obtained from histological and MR images. The co-registration of these volumes was obtained by using reference points (landmarks). The mean number of landmarks in control cases was 16 (sixteen) and, in sclerotic hippocampus, tests were made using 9, 16 e 32 points. Based on the results, it was possible to establish common spatial coordinates for histological and MR images, in order to allow point-to-point correlations. Satisfactory results were obtained with sclerotic hippocampi, although with less quality

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais freqüente de epilepsia focal refratária ao tratamento farmacológico em adultos. A ELT é uma entidade clínica heterogênea com diferentes perfis etiológicos, semiológicos e prognósticos. A ELT pode ser subdividida em mesial (ELTM) e neocortical (ou lateral), de acordo com a origem e semiologia das crises (CENDES, 2004; ANDRADE-VALENÇA, 2006; GUEDES, 2006; ANDRADDE-VALEÇA, 2008).

Os pacientes com ELTM, cujas crises originam-se de estruturas mesiais do lobo temporal, incluindo a amígdala, hipocampo e giro parahipocampal (GPH), constituem um subgrupo com características peculiares do ponto de vista da semiologia ictal, dos achados do eletroencefalograma (EEG), da patologia e da resposta à cirurgia. A semiologia ictal inclui uma aura (sensações epigástricas, alterações dismnésticas, entre outras) seguida por olhar fixo não responsivo (“staring”), automatismos orolimentares e sinais motores, incluindo postura distônica da mão contralateral ao foco epileptogênico e automatismos motores estereotipados da mão ipsilateral (BLÜMCKE, 2007; GUEDES, 2006; SOUZA, 2006; SILVA, 2004).

Na maioria das vezes, a ELTM tem seu início na infância tardia ou adolescência, geralmente com história prévia de insulto precipitante inicial (crises febris prolongadas, hipóxia, trauma crânio-encefálico ou infecções do sistema nervoso central). As crises parciais complexas (CPC) são o tipo predominante podendo ser incapacitantes para a vida do paciente. Embora os pacientes possam apresentar crises secundariamente generalizadas (tipo tônico-clônicas), o tratamento medicamentoso as suprime na maioria dos casos. As crises são geralmente auto-limitadas, de curta duração e seguidas por um período variável de confusão mental. Afasia pós-ictal pode ocorrer quando as crises acometem o lobo temporal dominante (BLÜMCKE, 2007; GUEDES, 2006; SOUZA, 2006; SILVA, 2004).

A investigação clínica dos pacientes com ELTM candidatos a cirurgia envolve os seguintes domínios principais: história clínica, EEG, exames de imagem estrutural e funcional, e por fim a avaliação neuropsicológica. A partir da convergência dos dados clínicos e dos resultados dos exames subsidiários é estabelecida a localização do foco epileptogênico (SAWRIE, 1998).

O EEG é a pedra fundamental na avaliação pré-operatória e deve ser realizado nos períodos ictal e pós-ictal, para evidenciar a lesão focal. O resultado pode ser normal ou demonstrar anormalidade não epileptiforme caracterizada por alentecimento intermitente nas faixas teta e delta sobre as regiões temporais méso-basais e/ ou atividade epileptiforme do tipo ponta e onda aguda, seguida ou não de onda lenta, é registrada com eletronegatividade máxima nos eletrodos T3-F7/T4-F8, e especialmente nos eletrodos esfenoidais, podendo ser unilateral, bilaterais na região temporal anterior ou difusos, síncronas ou assíncronas. Sendo de grande importância a monitorização do

EEG em conjunto com as alterações comportamentais do paciente, esse exame denomina-se vídeo-EEG, para isso o indivíduo tem de ser hospitalizado e suas DAES (drogas antiepilépticas) diminuídas ou retiradas totalmente na tentativa de observar suas crises habituais (Andrade-Valença, 2006, SOUZA, 2006; French, 1993; ENGEL, 1997; Cendes e Kobayashy, 2000; Guerreiro, 2000).

O exame de tomografia por emissão de fóton único (SPECT) analisa a perfusão cerebral. Em pacientes com ELTM, o SPECT interictal pode delimitar uma área de hipoperfusão em região temporal, enquanto o SPECT ictal pode delimitar uma área de hiperperfusão na mesma região correspondendo a localização do foco epileptogênico (ENGEL, 1997; CENDES e KOBAYASH, 200; GUERREIRO, 2000).

No exame de ressonância magnética (RM) o resultado pode ser normal ou mostrar redução no volume hipocampal em T1 e hipersinal em T2, caracterizando a esclerose hipocampal (EH). A atrofia pode se estender a outras estruturas do lobo temporal além do hipocampo, caracterizando a esclerose mesial temporal (EMT), ou envolver o lobo temporal como um todo. Esses achados podem ser unilaterais ou bilaterais, nesse caso, geralmente assimétricos (CENDES, 1993a; CENDES, 1993b; CENDES e ANDERMANN, 1996; ENGEL, 1997; CENDES e KOBAYASHY, 2000).

1.2. Formação Hipocampal

A formação hipocampal (FH)¹ é uma importante estrutura do encéfalo relacionada aos processos de aprendizado e memória, seja declarativa, espacial ou episódica. O termo FH refere-se a uma estrutura ou unidade funcional complexa localizada no lobo temporal mesial, constituída de quatro sub-regiões: o Corno de Amon (CA) ou hipocampo propriamente dito, o giro denteado (GD) ou fascia dentata (FD), o complexo subicular (subículo, para-subículo e pré-subículo) e o córtex entorrinal (Ent) (GUEDES, 2006).

O hipocampo propriamente dito é uma porção de córtex cerebral pertencente à região medial do lobo temporal. É composto por uma faixa de substância cinzenta dobrada sobre si mesma, sendo envolvido por uma fina camada de substância branca, que converge para formar a fímbria medial. O hipocampo se projeta para dentro do corno temporal do ventrículo lateral, estendendo-se por cinco centímetros em média. Após a abertura do corno temporal e remoção do plexo coróide, o hipocampo aparece macroscopicamente como um arco medialmente côncavo, que pode parecer um “cavalo marinho”. Nesse arco, podem-se distinguir três segmentos: cabeça ou parte anterior, de orientação transversal; corpo ou parte média, sagitalmente orientada; e cauda ou parte posterior, transversalmente orientada e situada sob o esplênio do corpo caloso (figura 1). A cabeça pode, ainda, ser chamada de “pé”, devido às digitações que apresenta

¹Também referida simplesmente como “hipocampo”

(GRAY, 1988; DUVERNOY, 1995; ROGACHESKI, 1998; DUVERNOY, 2005; STANDRING, 2005).

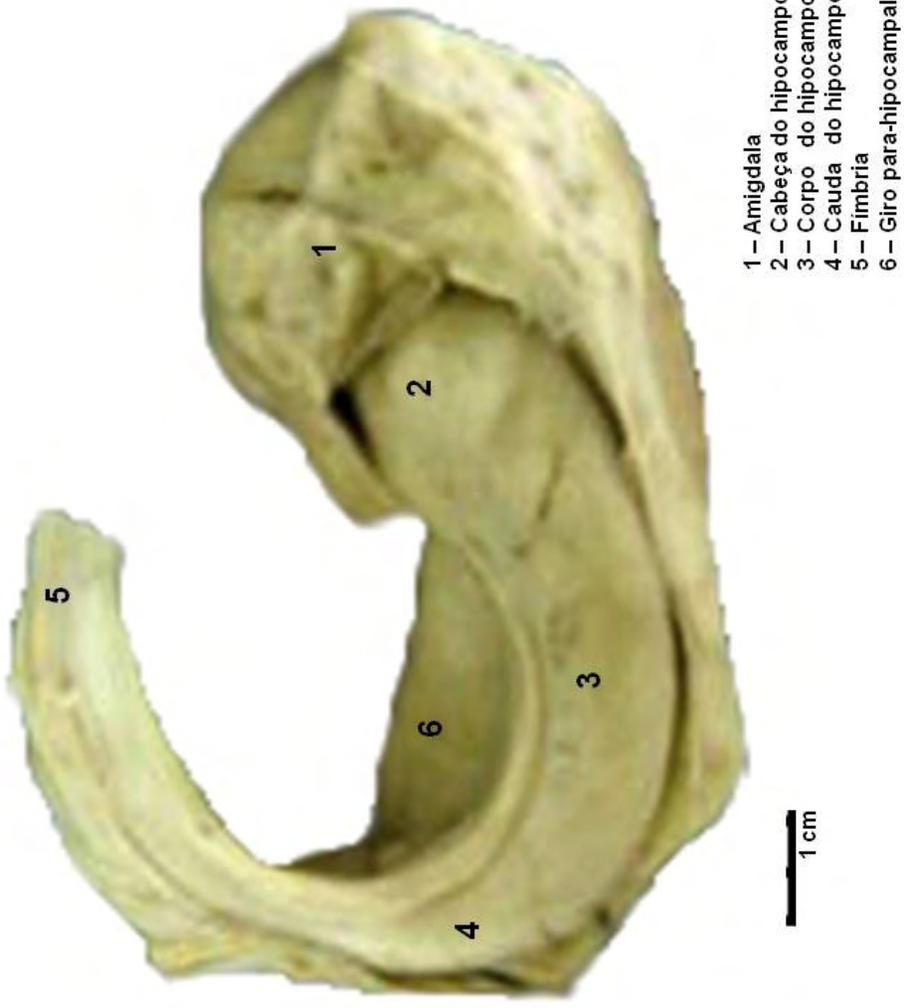


Figura 1: Anatomia macroscópica do hipocampo

Na era moderna, há crescente evidência do papel fundamental do hipocampo em diversos processos, principalmente na memória, fez com que o estudo dessa região se intensificasse. Foram feitas muitas descobertas importantes utilizando essa estrutura como modelo para investigação em situações fisiológicas e patológicas. Aproveitando-se as características da organização microscópica do tecido hipocampal, foram aprimoradas técnicas amplamente usadas em neurociência, como a histoquímica. A primeira descrição moderna da aparência da FH foi feita pelo anatomista Arantius em 1587, que a descreveu como sendo parecida com um “bicho-da-seda” (*bombycinus vermis*) ou com um cavalo marinho (*hippocampus*) se visto medialmente. Admite-se que a denominação “Corno de Ammon” (CA) foi introduzida por Garegeot em 1742, inspirada pela vista lateral do hipocampo, fazendo referência à figura do deus egípcio Amun, retratado como um homem com cabeça de carneiro (WALTHER,2002; EL FALOUGY, 2006; ANDERSEN, 2007).

1.2.1. Citoarquitetura

Esquemáticamente, pode-se dividir o hipocampo propriamente dito (ou Corno de Amon) em quatro diferentes regiões, CA1-CA4. Com exceção da área CA4, que tem natureza polimórfica, as demais áreas apresentam um mesmo padrão de organização. Os neurônios principais encontrados nessas áreas são piramidais e se dispõem de forma compacta em uma camada denominada *estrato piramidal* (LORENTE DE NO, 1934;

GRAY, 1988; INSAUSTI & AMARAL, 2004; DUVERNOY, 2005). Resumidamente, as camadas do hipocampo incluem (fig. 2):

(a) *Alveus*: é a camada mais externa do CA, sendo composto principalmente pelos axônios que saem da formação hipocampal em direção a outras regiões encefálicas e de alguns axônios que chegam ao hipocampo do septo;

(b) *Estrato oriens*: localizado entre o estrato *Alveus* e o estrato piramidal, é composto por esparsas células em cesto, pelos axônios que passam em direção ao *Alveus* e por dendritos basais das células piramidais do estrato piramidal;

(c) *Estrato piramidal* (ou camada piramidal): formada pelo corpo (soma) das células piramidais do hipocampo, onde ocorrem contatos inibitórios de interneurônios dos circuitos locais;

(d) *Estrato Radiado*: contêm os dendritos apicais das células piramidais, onde ocorre o contato com importantes aferências, como as fibras vindas de outras estruturas cerebrais e do hipocampo contralateral;

(e) *Estrato lacunoso*: consiste basicamente em uma região de passagem de fibras, como a via colateral de Schaffer (axônios que se projetam de CA3 para CA1);

(f) *Estrato molecular*: formado por interneurônios e pelas extremidades distais dos dendritos apicais das células piramidais.

O GD ou *FD* é um componente da FH e, à semelhança do CA, pode ser dividido em camadas, a saber:

(a) *Estrato molecular*: contém os dendritos apicais das células granulares, que recebem dois tipos de projeções aferentes: uma glutamatérgica que se origina nas camadas superficiais do Ent (via perfurante) e termina nos dois terços externos da camada molecular (sinapses excitatórias); e outra colinérgica, proveniente do núcleo septal medial que termina de forma difusa;

(b) *Estrato Granuloso*: contém as células principais do GD (células granulares) e interneurônios;

(c) *Estrato Polimórfico* ou *Hilo*: contém os axônios das células granulares (fibras musgosas) e interneurônios.

O circuito principal da FH inicia-se no GPH. As fibras que deixam o Ent em direção ao hipocampo constituem a chamada “via perfurante” e inervam os dendritos das células granulares na região da camada molecular do GD. As principais eferências do GD são os axônios de células granulares, comumente denominados de fibras musgosas, que liberam principalmente glutamato, e fazem sinapses com neurônios piramidais de CA3, interneurônios e células musgosas no CA4 (hilo). Dos neurônios piramidais de CA3 emergem axônios, denominados Via Colateral de Schaffer, que terminam em neurônios piramidais em CA1, efetuando a terceira sinapse do circuito hipocampal. Este circuito e suas conexões formam a clássica via tri-sináptica hipocampal (Andersen et al., 1969; O Keefe, 1978; DUVERNOY, 2005).

Existe uma região de transição entre o córtex temporal inferior (isocórtex - seis camadas) e o hipocampo propriamente dito (alocórtex - trilaminar), onde as camadas se tornam gradativamente mais simples, essa região é conhecida como complexo subicular ou simplesmente subículo. Essa região também faz parte da F.

A região de CA1 é a maior região do hipocampo, podendo ser caracterizada por uma diversidade de tipos celulares e por um estrato piramidal espesso, é também a região que mais varia ao longo de sua extensão. A região CA2 possui um estrato piramidal estreito e muito denso. Na região CA3, o estrato piramidal tem uma espessura intermediária em relação a CA1 e CA2 sendo características dessa região as maiores células piramidais da FH. Na região CA4, os corpos celulares são bastante esparsos e estão em meio a uma abundância de processos neuronais (dendritos, axônios e terminações), incluindo as fibras musgosas (AMARAL, 1978; INSAUSTI & AMARAL, 2004; DUVERNOY, 2005; EL FALOUGY & BERNUSKA, 2006). (fig. 2)

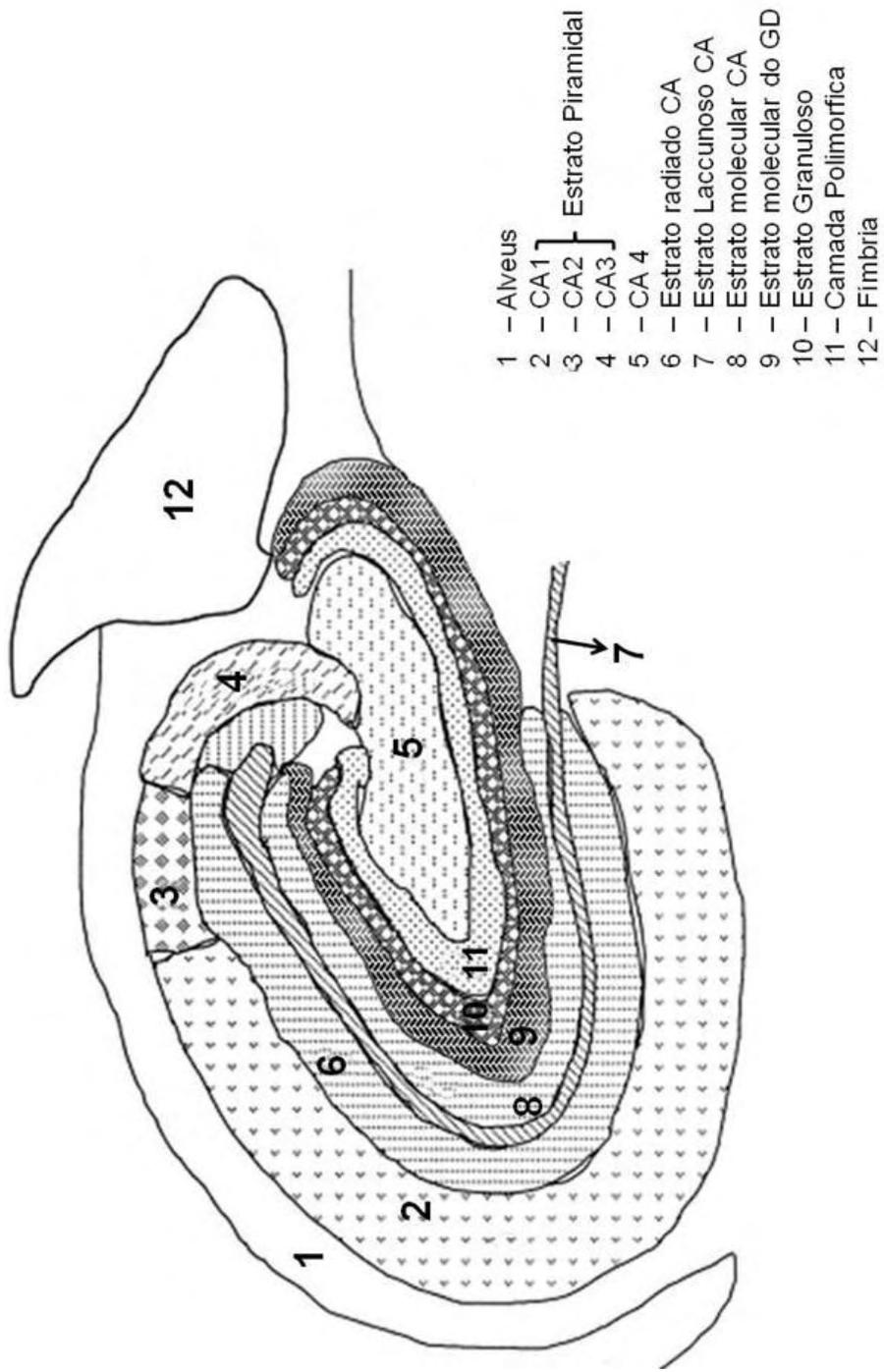


Figura 2: Classificação da citoarquitetura do hipocampo, segundo Lorente de Nó

1.3. Imagem por Microscopia de luz e Esclerose Hipocampal

A primeira descrição microscópica das alterações no hipocampo em pacientes com epilepsia foi feita por Sommer², sendo dele também a primeira correlação entre crises epiléticas e alterações histopatológicas no hipocampo. Margerison, em 1966, através de estudos de cérebro post-mortem de pacientes com ELT, observou um padrão de perda neuronal específico, com grande destruição dos neurônios piramidais do hipocampo principalmente nas áreas CA1 e *prosubiculum* (também denominado “setor de Sommer”), corroborando as descrições de Sommer. (MARGERISON & CORSELLIS, 1966; GATES, 1990).

Do ponto de vista anatomopatológico, a esclerose hipocampal (EH) é caracterizada por perda neuronal e gliose, especialmente das células do setor de Sommer (CA1 e *prosubiculum*) e dos neurônios da região hilar (CA4), com relativa preservação de CA2, *subiculum* e camada granular do GD. Adicionalmente, observa-se reorganização axonal, caracterizada por brotamento (“sprouting”) de colaterais axônicos das células granulares (as fibras musgosas), na região da camada molecular interna do GD. Pode ser encontrada a dispersão das células granulares, caracterizada pela perda da justaposição habitual das células granulares, produzindo um aumento da sua espessura e dos espaços intercelulares, e também pode ocorrer a bilaminação da

² Sommer W. Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie. Arch Psychiat Nervenkr 1880; 308: 631-675. apud Gates, 1990

camada granular (MARGERISON & CORSELLIS, 1966; Andrade-valença 2006; SILVA, 2007).

A expressão “esclerose mesial temporal” (EMT) foi introduzida por Falconer e colaboradores (1964) para descrever a lesão caracterizada por perda neuronal e gliose envolvendo, principalmente, o hipocampo, a amígdala ou ambos, notadamente as camadas de células piramidais do Corno de Ammon (CA) e a camada granular do giro dentado. A EMT é a causa mais comum de epilepsia com origem ou envolvimento primário do lobo temporal e é o achado mais comum nos casos de epilepsia fármaco-resistente (BLÜMCKE, 2007; JUNIOR, 2001).

Uma primeira tentativa semi-quantitativa sistemática de estimar a perda de células do hipocampo foi publicada em 1992 por Wyler, referindo-se ao percentual da perda de células piramidais identificadas nas subseções do hipocampo (CA1-CA4). O “Wyler-score”³ inclui as classes: **EH Grau 1:** dano brando, sem perda ou perda neuronal leve (<10%) da camada de células piramidais de CA1, CA3 e/ou CA4, **EH Grau 2:** dano moderado, gliose e perda neuronal moderada (10-20%) em CA1, CA3 e/ou CA4, **EH Grau 3:** dano grave, gliose com perda neuronal maior que 50% em CA1, CA3 e CA4, mas poupando CA2, **EH Grau 4:** dano severo, gliose com perda neuronal maior que 50% em todos os setores do hipocampo. A GD, subículo e GPH também podem estar envolvidos no grau 4. Esse sistema de classificação é pratico, mas é pouco preciso e não considera a história clínica do paciente (ROGACHESKI, 1998; BLÜMCKE, 2007; FAHRNER, 2007).

³Wyler AR, Dohan FC, Sxhweitzer JB, Berry AD (1992) A grading system for mesial temporal pathology (hippocampal sclerosis) from anterior temporal lobectomy. J epilepsy 5:220-225 apud FAHRNER, 2007

1.4. Imagem por Ressonância Magnética e Esclerose Hipocampal

Diferentemente da tomografia computadorizada (TC) e outros métodos de imagem; a ressonância magnética (RM) agrega um conjunto de técnicas que permitem avaliar diversos aspectos da função, estrutura e bioquímica do encéfalo, de maneira não invasiva. A RM é, nos dias, de hoje o método de escolha para investigação por imagem de pacientes com epilepsia, particularmente aqueles com crises refratárias. Em imagens obtidas por RM, o hipocampo normal pode ser facilmente observado no plano coronal, sendo isointenso à substância cinzenta cortical em todas as seqüências de pulsos (CARRETE JR, 2002).

Os principais achados da EMT à RM são a atrofia e a hiperintensidade de sinal hipocampal, nas seqüências de longo TR e T2 limitada ao hipocampo. Outros achados incluem as seguintes mudanças ipsilaterais: dilatação do corno inferior do ventrículo lateral, atrofia ou aumento de sinal da amígdala, atrofia difusa do lobo temporal, atrofia da substância branca parahipocampal, hipointensidade em T1 e alterações do GPH (JUNIOR, 2001; SOUZA et al.,2006).

O diagnóstico da EH pela RM se traduz por diminuição do volume ou aumento do sinal hipocampal nas seqüências ponderadas em T2 ou na seqüência FLAIR, podendo ser acompanhados de modificação no formato e na estrutura interna do hipocampo. A atrofia hipocampal pode ser unilateral ou bilateral, com uma intensidade geralmente

assimétrica. As técnicas quantitativas como a volumetria e o tempo de relaxação nas seqüências ponderadas em T2 podem ser úteis nos casos de alterações sutis ou comprometimento bilateral dos hipocampos (DIEGUES, 2004; ANDRADE-VALENÇA, 2006).

A quantificação do sinal T2 de RM pela técnica conhecida como relaxometria T2 pode, igualmente, ser utilizada para a avaliação do tecido hipocampal anormal, aumentando a sensibilidade do método na detecção de EH, principalmente para casos de anormalidade de sinal discreta ou de lesão bilateral, as quais poderiam não ser reconhecidas apenas em uma análise visual (JACKSON, 1993; KUZNIECKY, 1995; DUNCAN, 1996).

1.5. Correlação entre imagem por RM e achados microscópicos

A histopatologia quantitativa desenvolveu-se paralelamente com a imagem de RM e pode permitir uma interpretação mais exata e sofisticada da estrutura do tecido. Trabalhos recentes tentam demonstrar que fragmentos cirúrgicos de lobo temporal, bem como as lâminas histológicas produzidas a partir dos mesmos, podem ser alinhados com as imagens da RM obtidas *in vivo* no pré-operatório. Assim, os dados quantitativos de RM e os dados quantitativos histológicos poderiam ser diretamente comparados. A partir desse tipo de abordagem, Eriksson e colaboradores observaram

uma correlação positiva entre o tempo de relaxação T2 e o número de neurônios marcados com imunohistoquímica para NeuN (ERIKSSON, 2005; ERIKSSON, 2007).

Estudos quantitativos por RM e achados histopatológicos em pacientes com ELT têm sugerido uma correlação positiva entre as medidas volumétricas e a densidade neuronal do hipocampo (CASCINO, 1991; LENCZ, 1992; LEE, 1995).

Recentemente têm-se buscado estabelecer protocolo de co-registro de imagens de RM e histologia, por exemplo, Grinberg e col. (2009) desenvolveram um protocolo para co-registro de encéfalos inteiros. Após a RM *in situ* os encéfalos foram perfundidos e emblocados com celoidina, cortados 440 μ m. A correção das deformações e o co-registro deram-se pela utilização do software Amira® 4.1 (Mercury Computer Systems Inc.), sendo possível a co-locação de áreas na RM e histologia. A aplicação deste protocolo para o estudo da ELTM poderia trazer benefícios para o estudo da EH nos casos de epilepsia refratária.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho pretende realizar o co-registro de imagens obtidas por ressonância magnética e os achados histopatológicos de hipocampos escleróticos de pacientes com ELTM.

2.2 Objetivos específicos

1. Adequação da técnica de co-registro descrita por Grinberg e col (2009) para hipocampos isolados;
2. Determinar coordenadas espaciais comuns às imagens de microscopia e de RM, a fim de permitir a correlação ponto-à-ponto dos achados patológicos.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizados hipocampos com ELTM submetidos a cirurgia e indivíduos necropsiados provenientes FMUSP. Em um primeiro momento os hipocampos controle foram utilizados na adequação técnica do protocolo, que em seguida foi aplicado aos casos de ELTM.

3.1 Sujeitos Controle

Os hipocampos controles foram obtidos no Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudo de Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC), cuja fonte é o Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC), seguindo os seguintes critérios: idade entre 50 e 60 anos, tempo de morte inferior a 16 horas, causa do óbito não associada a patologia neurológica (Tab. 1). Todos os critérios estiveram de acordo com o protocolo do BEHGEEC, onde a avaliação neuropatológica para doenças neurodegenerativas e cerebrovasculares segue padrões internacionais com uso de imunohistoquímica. A avaliação cognitiva foi obtida através de um informante, que assinou o termo de consentimento ao início da entrevista (anexo I) (GRINBERG, 2007).

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP com nº 285/04 (anexo II).

Tabela 1. Dados clínicos dos sujeitos controles.

Identificação	Sexo	Idade óbito (anos)	Tempo de morte (horas)	escolaridade (anos)	Causa óbito	Causas básicas/ Achados clínicos	Antecedente patológico
CTRL001	Fem.	60	7,26	5	EAP	IAM, Arteriosclerose coronariana	HAS/DM
CTRL002	Fem.	52	13,38	11	Metastases pulmonares multiplas	carcinoma de mama direita	Câncer palato
CTRL003	Masc.	53	14,61	8	EAP	cardiomegalia hipertrófica dilatada / HAS	ICC, DPOC enfisema
CTRL004	Masc.	51	13,33	7	IAM	Aterosclerose coronariana / IAM	HAS
CTRL005	Masc.	58	12	4	EAP	HAS	HAS/DM
CTRL006	Masc.	53	15,65	2	EAP	cardiopatia dilatada	-
CTRL007	Fem.	54	13,91	11	IAM	Aterosclerose severa	bronquite/ asma

CTRL = controle; Fem = feminino; Masc = masculino; EAP = edema agudo pulmonar; IAM = Infarto agudo do Miocárdio; HAS = hipertensão arterial sistêmica; DM = Diabetes mellitus; ICC = Insuficiência Cardíaca congestiva; DPOC = Doença pulmonar obstrutiva crônica.

3.2 Pacientes com ELTM

Neste estudo foram incluídos pacientes submetidos a cortico-amigdaló-hipocampectomia para tratamento de ELTM fármaco-resistente associada a EH, operados em hospitais governamentais da cidade de São Paulo. Os pacientes incluídos foram submetidos a uma detalhada anamnese, video-EEG e exames de RM, que confirmavam o diagnóstico. Os dados clínicos incluíram idade de início da epilepsia, idade na cirurgia, duração da epilepsia, insulto precipitante inicial (IPI), lado operado e história familiar (Tab. 2). Os pacientes deram consentimento da utilização do material assinando o termo de consentimento livre esclarecido (anexo III).

Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes com ELTM

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Idade de Início (anos)	Duração da epilepsia (anos)	IPI	Lado	História Familiar de epilepsia
Pct 001	25	Masc	1,6	23	crise febril	E	não
Pct 002	49	Fem	7	42	Não	E	sim
Pct 003	29	Fem	4	25	Não	E	não

IPI = insulto precipitante inicial; Pct = paciente; Masc= masculino; Fem = feminino; E = esquerdo

3.3 Manuseio e fixação do tecido

3.3.1 Hipocampos controles

Após a coleta do encéfalo pelo SVOC e o encaminhamento para o BEHGEEC, os encéfalos foram fixados por imersão em paraformaldeído (PFa) 4% em tampão fosfato (PB) a 0,1 M por 15 dias. Após esse período, foi realizada a desconexão do corpo caloso, os hemisférios foram identificados e mantidos em PFa 4% por mais 15 dias. Após um mês os hipocampos foram dissecados e mantidos por 5 dias em PFa 1%. Os hipocampos foram fotografados com câmera digital, para análises macroscópicas e comparação posterior com a microscopia. Os hipocampos já fixados foram emblocados em Agar a 9% e escaneados em equipamento de RM 1,5T.

3.3.2 Hipocampos escleróticos

Imediatamente após a ressecção cirúrgica, os hipocampos foram fixados por imersão em uma solução de PFa 4% pelo período de 24 a 48 horas. Os hipocampos permaneceram em uma solução de PFa 1% em PB a 0,1M até a realização da RM. Os fragmentos foram fotografados com câmera digital, para análises macroscópicas e comparação posterior com a microscopia. Os fragmentos já fixados foram emblocados em Agar a 9% e escaneados em equipamento de RM de 1,5T.

3.4 Exame de RM

Os fragmentos foram submetidos a exame de RM realizados em um sistema de 1.5 T equipado com gradientes de 33 mT/m (GE Health Care, Milwaukee – EUA) no Departamento de Diagnóstico por Imagem da Universidade Federal de São Paulo. Todos os estudos incluíram as seguintes aquisições:

- 1) Localizador (Loc) axial: GRE TR= 63.7 ms; TE= 1.6 ms; 256x128;1 NEX, 5/0.5 mm, FOV 24cm, N = 3 img., 2D;
- 2) Loc sagital coronal: GRE TR = 15ms; TE = 5 ms; 256 x 128; 1 NEX, 5/0,5mm; FOV 24cm, SL=9.5; N=6 img, 2D;
- 3) CISSDP FSE: TE = 30.8 ms; TR = 3000ms; TI = 150 ms; 3 mm/0.3 mm; FOV = 16cm; 256 x 224; 4 NEX, 3D.

3.5. Análise Histológica

Após a aquisição das imagens de RM, os hipocampus emblocados em agar foram seccionados com uma navalha, ao longo de seu maior eixo, em blocos de 6mm de espessura. O perfil dos blocos foi fotografado com câmera digital com resolução de

10 megapixels, para a análise macroscópica. Os fragmentos foram retirados do ágar e colocados em solução crioprotetora de sacarose 30%, congelados e cortados em fatias com 60 μm de espessura utilizando um criostato Leica CM 1850. As fatias foram coletadas em solução de PB a 0,1M contendo 0,001% de azida sódica e armazenadas a 4°C.

3.5.1. Coloração de *Nissl* por Violeta de Cresila

A coloração de *Nissl* é utilizada para evidenciar o citoplasma de neurônios. O citoplasma contém várias estruturas, inclusive o corpúsculo de Nissl (ou substância de Nissl). Esses corpúsculos são compostos, basicamente, pelo retículo endoplasmático rugoso, onde se encontram os complexos formados pelos ribossomos e os correspondentes fragmentos de RNA mensageiro.

A coloração foi realizada em uma em cada vinte fatias, nos casos controle, e uma em cada dez fatias, em hipocampos escleróticos. Após a montagem das fatias em lâminas gelatinizadas, as amostras foram secas a temperatura ambiente durante uma noite. Para a coloração, as lâminas foram re-hidratadas através de banhos sucessivos em solução de etanol I 100% (absoluto), etanol 85%, etanol 70%, etanol 50%, H₂O destilada (H₂O_d) (3 minutos em cada solução). Os cortes foram mergulhados no corante violeta de cresila (0,5%) dissolvido em solução de acetato tamponado em pH 3,8 de 2 a 7 minutos e, em seguida, lavados em H₂O_d com ácido acético para remoção

do excesso do corante. Por fim, iniciou-se a desidratação dos cortes, através de passagens sucessivas em álcool com concentrações crescentes, na ordem inversa ao processo de hidratação (etanol 50%, etanol 70%, etanol 85%, etanol I 100%, Xilol I, Xilol II). As lâminas histológicas foram montadas com lamínulas utilizando meio de montagem (Entellan® Merck).

Para a análise da coloração, foi inicialmente utilizado um sistema computadorizado de captura e análise de imagens, constituído por um microscópio Nikon Eclipse E600, uma câmera EXWAVE HD SONY e um computador para armazenamento e processamento das imagens. Esse protocolo foi comparado com um procedimento de digitalização alternativo, utilizando o escaneamento direto das lâminas histológicas através de um escâner EPSON STILUS OFFICE TX300F.

3.6 Correlação entre Imagens RM e histologia

As imagens dos fragmentos histológicos digitalizados foram comparadas às imagens obtidas pelo exame de RM após processamentos por uma serie de programas.

As imagens de RM foram inicialmente convertidas do formato “dicom” para o formato “analyze” pelo programa MRIconvert (disponível em: <http://lcni.uoregon.edu/~jolinda/MRIConvert>). As imagens convertidas foram importadas

para o programa de reconstrução 3D Amira 5.0[®] (Visage Imaging[™]), através do qual foram geradas imagens volumétricas.

As imagens histológicas passaram pelo seguinte processamento: Cada fragmento foi fotografado com uma objetiva de 2x de aumento em vários quadros. A combinação dos quadros foi executada com o programa 'autostich' (disponível em: <http://www.atostich.net>), gerando uma nova imagem. Alternativamente, as imagens de cada fatia foram obtidas através de escaneamento direto. Todas as imagens histológicas foram salvas em formato JPEG, tiveram suas dimensões padronizadas (18cmx12cm e 72ppm) e foram numeradas seqüencialmente com auxílio do programa IrfanView (diponível em: <http://www.irfanview.com>). Após todas essas etapas, as imagens finalmente foram processadas no programa Amira 5.0[®] para a obtenção do volume 3D, a partir do protocolo de Gringerb e Heinsen (2007). O co-registro dos volumes da histologia e da RM foi executado com o auxílio de uma ferramenta específica do programa Amira[®].

3.7 Comitê de ética

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo- UNIFESP- EPM, n°0457/08 (anexo IV).

4. RESULTADOS

Em nosso estudo foram processados 13 (treze) hipocampos-controles provenientes do BEHGEEC, dos quais 2 (dois) foram usados para adequar a seqüência de aquisição de imagens da RM, 3 (três) para adequação da técnica de histologia e 1 (um) foi excluído por problemas na armazenagem. Os demais 7 (sete) hipocampos-controles seguiram o protocolo já adequado e aperfeiçoado (descrito na sessão casuística e métodos). Na figura 3, é representada a comparação das técnicas de Grinberg e col. (2009), e a apresentada neste trabalho.

Em relação aos dois protocolos de aquisição de imagens dos cortes histológicos (microscópio *versus* escaner), o melhor resultado foi obtido através do escaner. Para obtenção de imagens através de microscópio com câmara acoplada, era necessário utilizar a objetiva de menor aumento (2x), originando mais de 50 aquisições por fatia em hipocampos escleróticos e aproximadamente 200 em hipocampos controle. O resultado eram montagens curvas que dificultavam a geração de um volume 3D histológico (fig. 4). A utilização do protocolo com escaner facilitou não só a aquisição das imagens, mas também trouxe vantagens na orientação da aquisição e no alinhamento das imagens histológicas para a geração dos volumes 3D para o co-registro com imagens de RM.

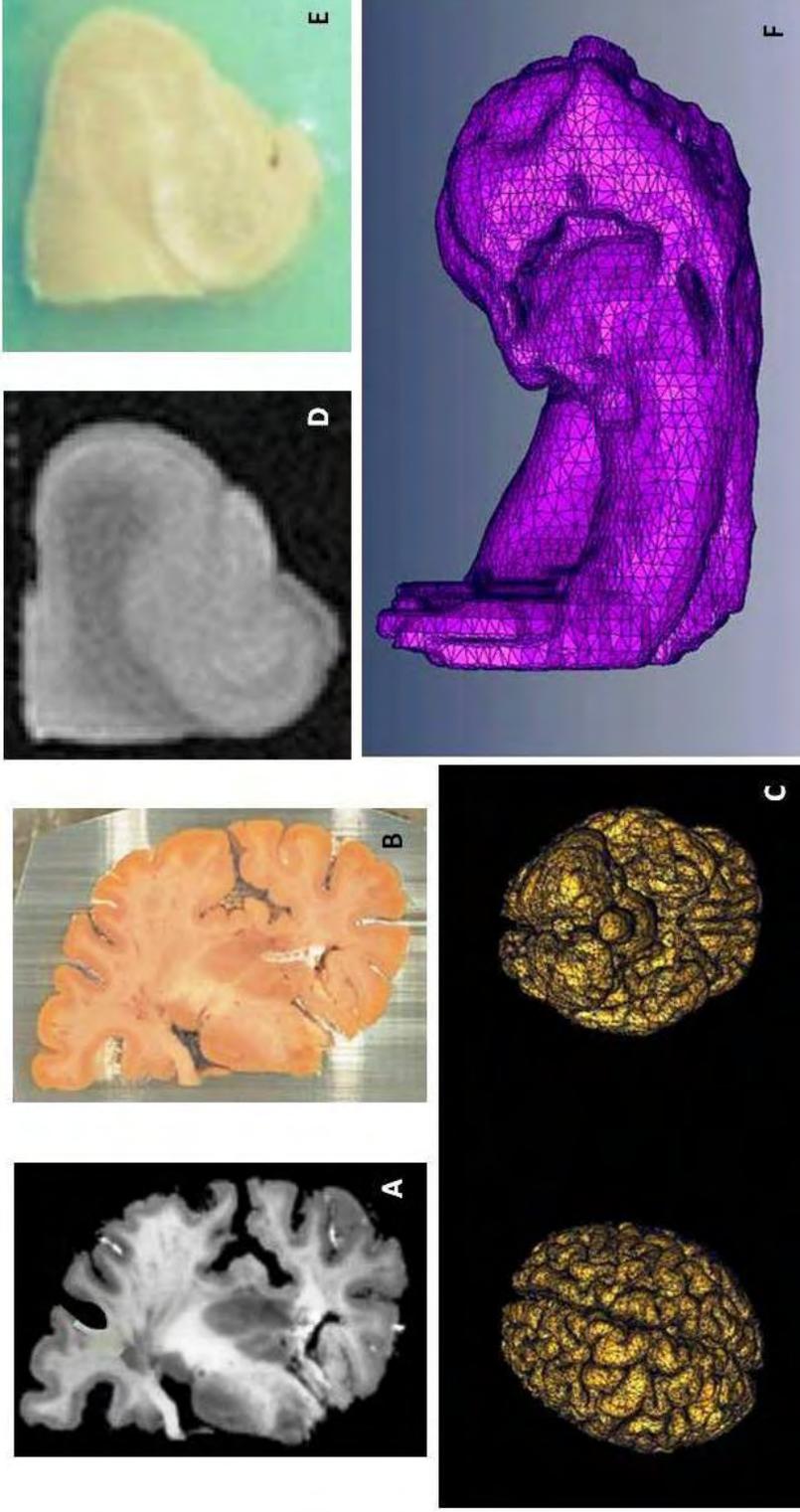


Figura 3. Comparação entre imagens 3D cérebro inteiro e hipocampo controle. Acima estão representados os resultados da transformação 3D: (A) fatia de RM de um hemisfério cerebral, (B) fotografia digital macroscópica e em (C) volumes 3D de um cérebro (imagens cedidas por Lea Tenenolz Grinberg & Helmut Heinsen), e o resultado que obtivemos na adequação da técnica para os hipocampus com o programa Amira® são apresentados em (D) fatia de RM, (E) fotografia digital macroscópica e em (F) é representado o volume 3D do hipocampo.

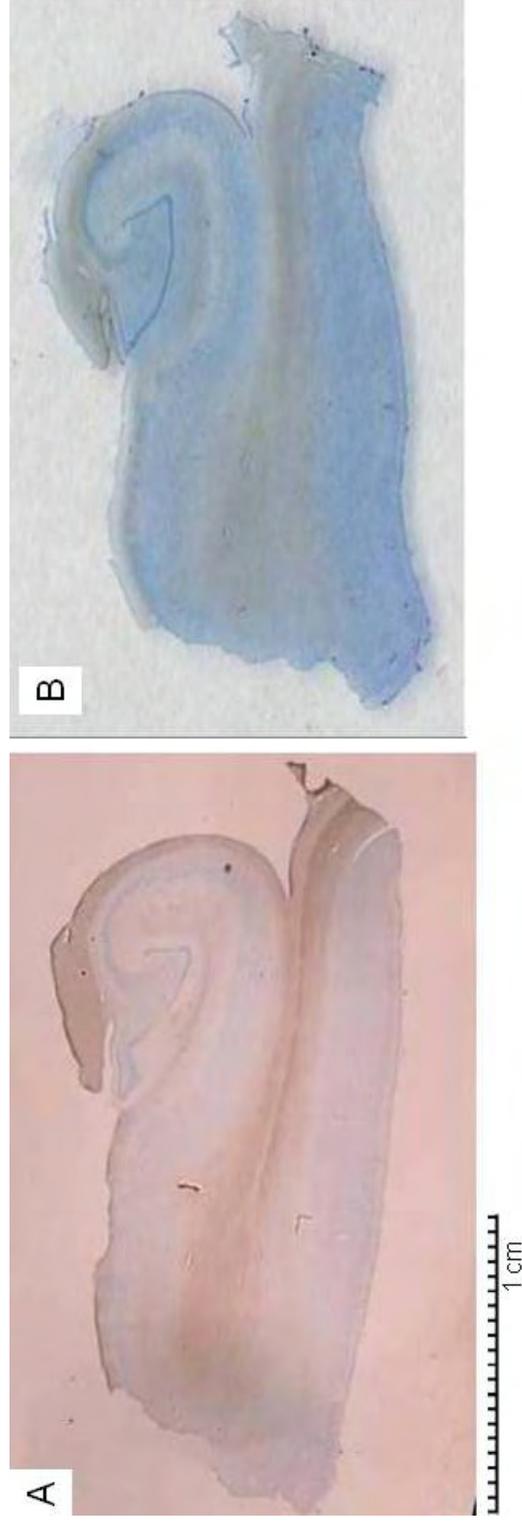


Figura 4. Comparação entre as técnicas de aquisição de imagem histológica. Nesta imagem são apresentados o mesmo corte histológico sendo (A) imagem adquirida em microscópio com câmera acoplada no aumento de 20X. Foram necessárias aquisições de 121 quadros para geração dessa imagem, e (B) imagem adquirida através do escaneamento da face da lâmina.

Dos hipocampos controles incluídos (n=7), foram obtidas imagens histológicas e de RM (fig. 5). Das imagens foram gerados volumes 3D e, após a sobreposição desses volumes, foi obtido um terceiro volume (co-registro). No co-registro pode-se observar coordenadas espaciais de comparação (fig. 6).

Com relação aos hipocampos escleróticos (n=3), como é demonstrando na fig. 7, obtivemos resultados satisfatórios, porém com uma qualidade inferior em relação aos controles. A pior qualidade dos resultados nos hipocampos escleróticos poderia ser explicada por vários motivos: (I) a preservação anatômica dos espécimes cirúrgicos era naturalmente inferior, dificultando a orientação tanto pra RM quanto para o corte histológico; (II) áreas hemorrágicas, freqüentemente observadas nos fragmentos cirúrgicos, resultavam em perdas importantes nos cortes histológicos, e finalmente (III) as deformidades resultantes do processamento histológico em tecido esclerótico eram mais acentuadas. Todos esses fatores contribuíram para dificultar a produção do volume 3D e co-registro em hipocampos escleróticos.

Para a realização dos co-registros nos modelos 3D de RM e histologia foram utilizados pontos de referência (“landmarks”) (figura 8). A quantidade de pontos de referência nos controles foi em média 16 (dezesesseis) e nos hipocampos escleróticos foram feitos testes com 9, 16 e 32 pontos de referência.

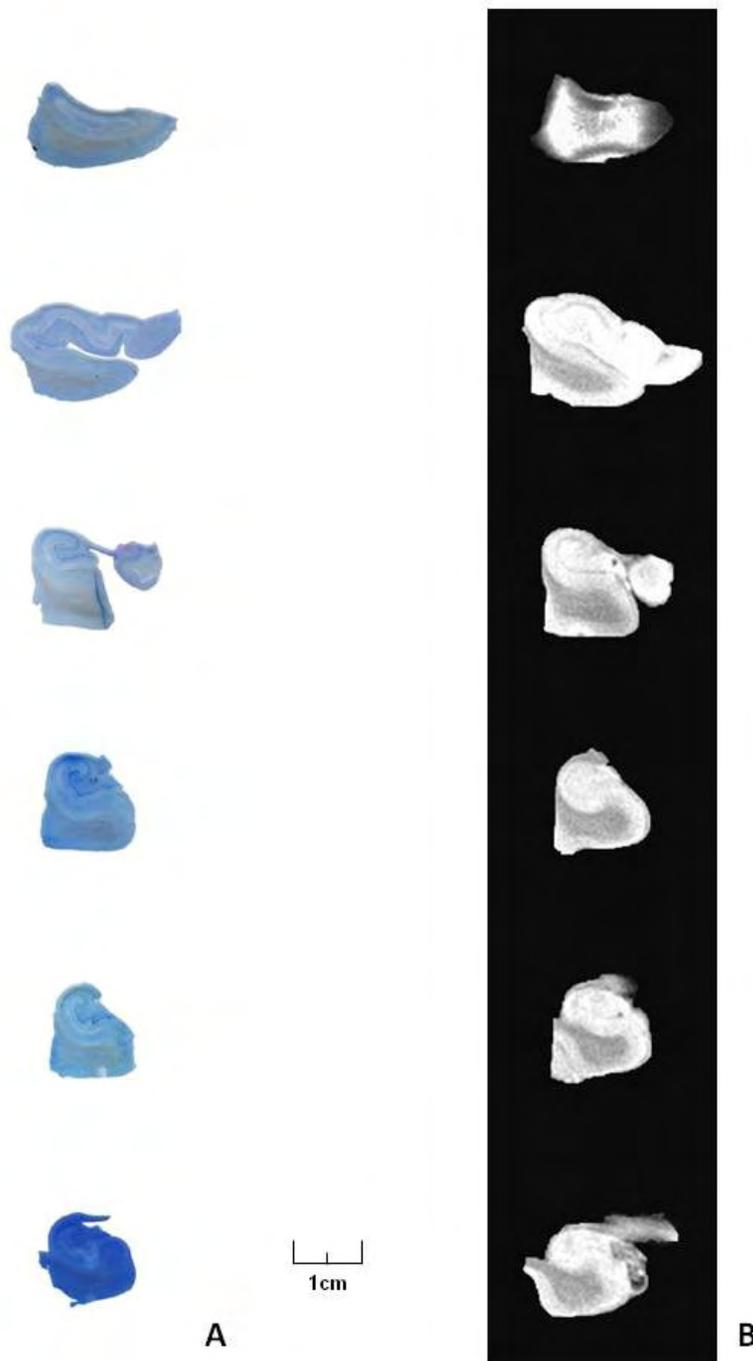


Figura 5: Representação de aquisição de imagem histológica e de RM. (A) seqüência de imagens de cortes histológicos corados com violeta de cresila com espessura de $60\mu\text{m}$, na escala de 1:5 (onde é apresentado 1 corte a cada 5 cortes corados) e, (B) seqüência de imagens de RM espessura de 1mm, na escala de 1:8 (apresentação de 1 fatia a cada 8 da seqüência adquirida).

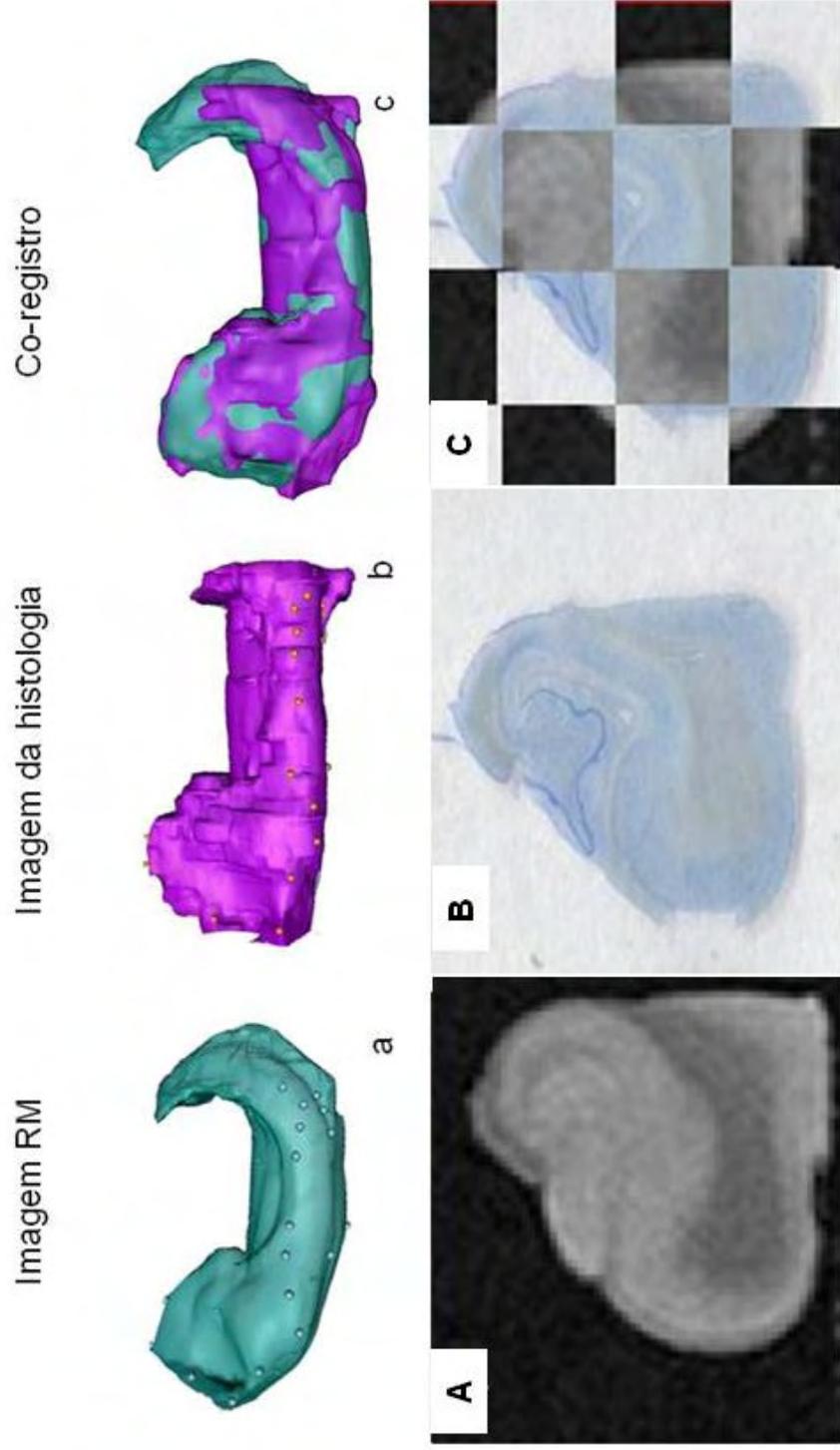


Figura 6. Correlação entre imagens de RM ex vivo e de histologia em hipocampus controles. Acima estão representados os volumes reconstruídos digitalmente a partir da RM ex vivo (a), da histologia (b) e do co-registro de ambos (c). Abaixo estão representadas imagens de uma mesma fatia do hipocampo na RM (A), na histologia (B) e a sobreposição de ambas (C)

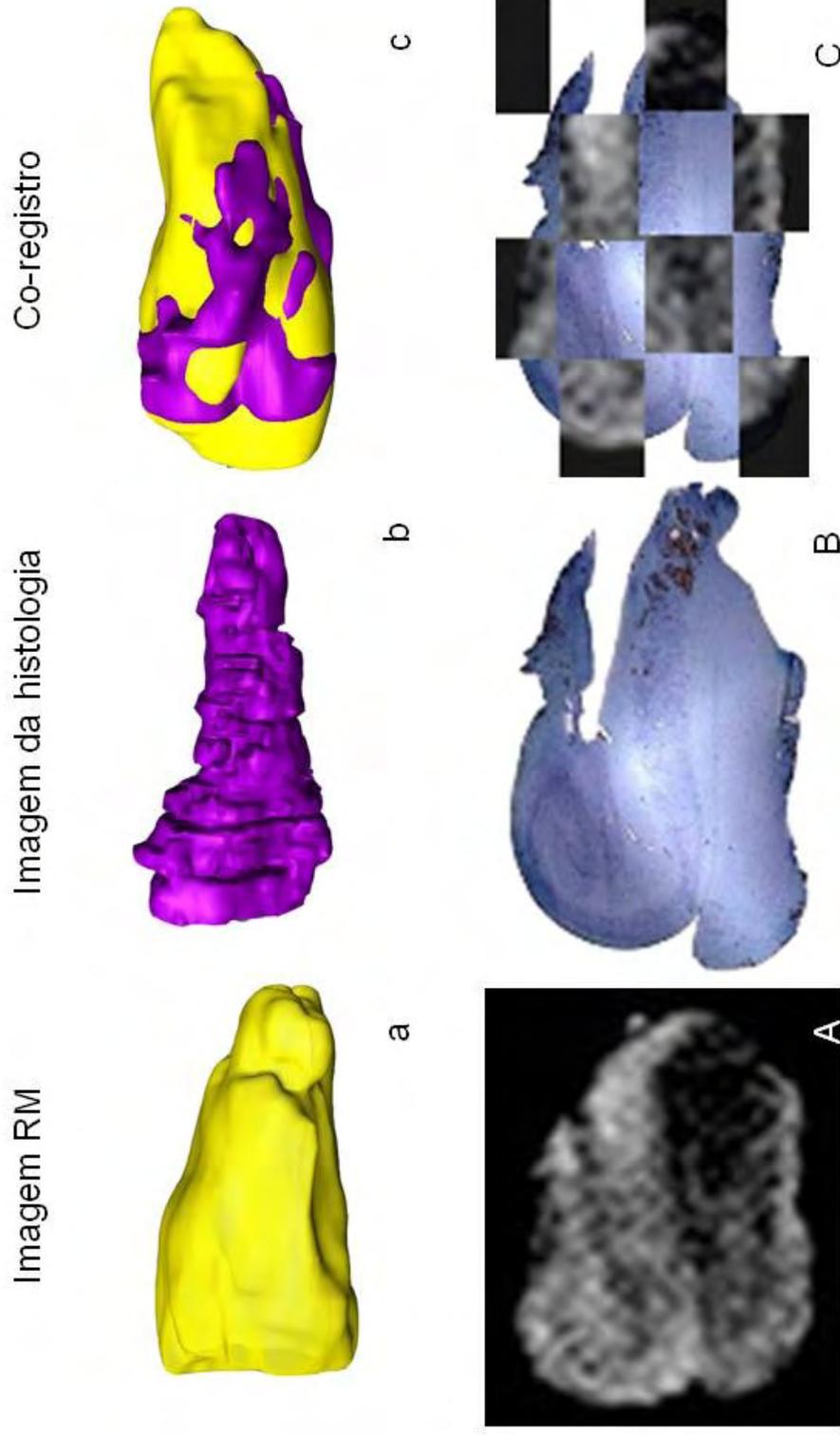


Figura 7. Correlação entre imagens de RM e de histologia em hipocampus escleróticos. Acima estão representados os volumes reconstruídos digitalmente a partir da RM (a), da histologia (b) e do co-registro de ambos (c). Abaixo estão representadas imagens de uma mesma fatia do hipocampo na RM (A), na histologia (B) e a sobreposição de ambas (C)

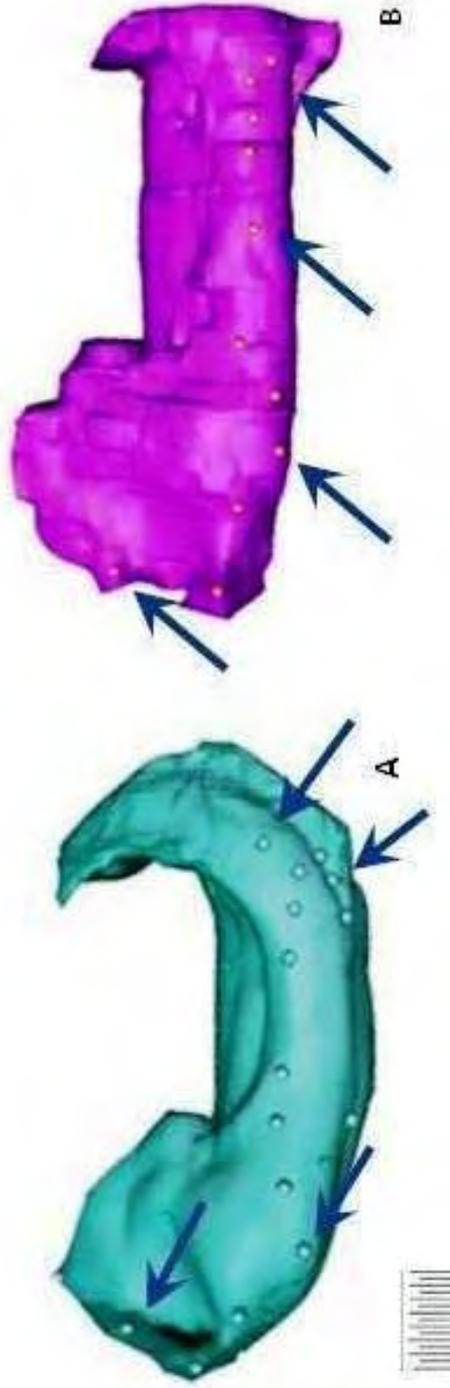


Figura 8: Modelos 3D de hipocampos e pontos de referência. (A) volume 3D de imagens de RM e (B) volume 3D de imagens histológicas, as setas azuis indicam os pontos de referências (landmarks) utilizados no co-registro.

O protocolo para aquisição de imagens de RM e histologia resultou em um maior número de imagens de RM em relação ao número de fatias histológicas para cada hipocampo. A diferença entre o número de fatias histológicas e imagens de RM foi corrigida através da geração de “fatias híbridas” (interpolação) pelo próprio programa de processamento de imagens Amira® (tab. 3 e fig. 9). Essas “fatias híbridas” permitiram uma correlação mais precisa com as imagens de RM correspondentes (fig10).

Tabela 3: Números de fatias histológicas antes e depois da interpolação

Hipocampos	RM	Histologia	Interpolação
CTRL 001	60	37	58
CTRL 002	52	24	49
CTRL 003	64	28	60
CTRL 004	80	44	77
CTRL 005	64	36	60
CTRL006	60	31	59
CTRL 007	60	32	51
Pct 001	48	25	45
Pct 002	50	26	47
Pct 003	58	29	55

RM = ressonância magnética; CTRL = controle; Pct = paciente

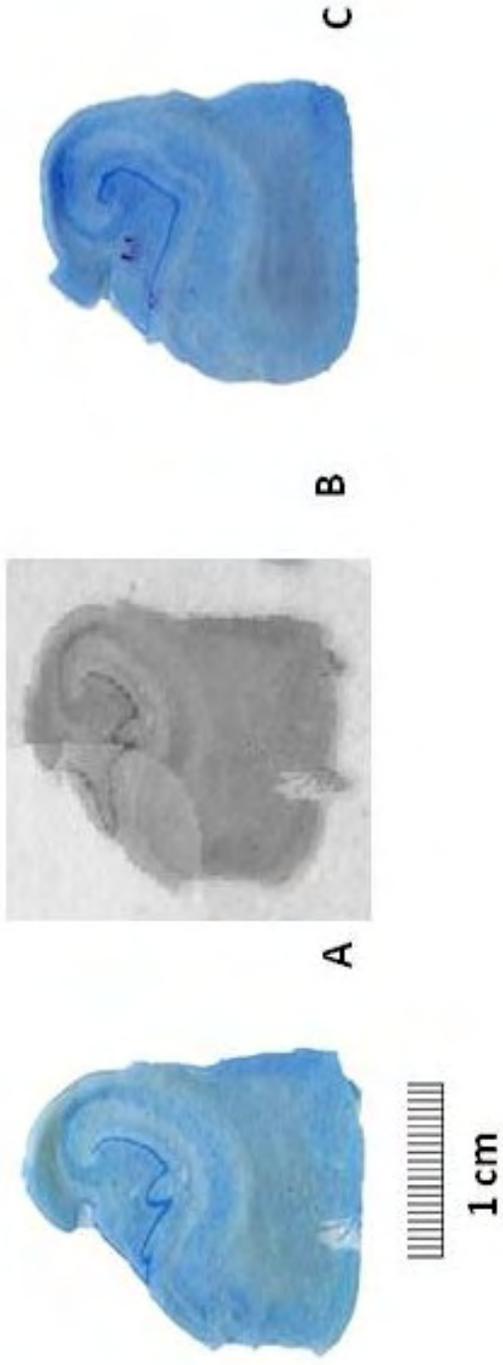


Figura 9: Interpolação das imagens histológicas. (A e C) imagens histológicas, quando essas imagens são combinadas tem como resultado uma fatia híbrida (B).

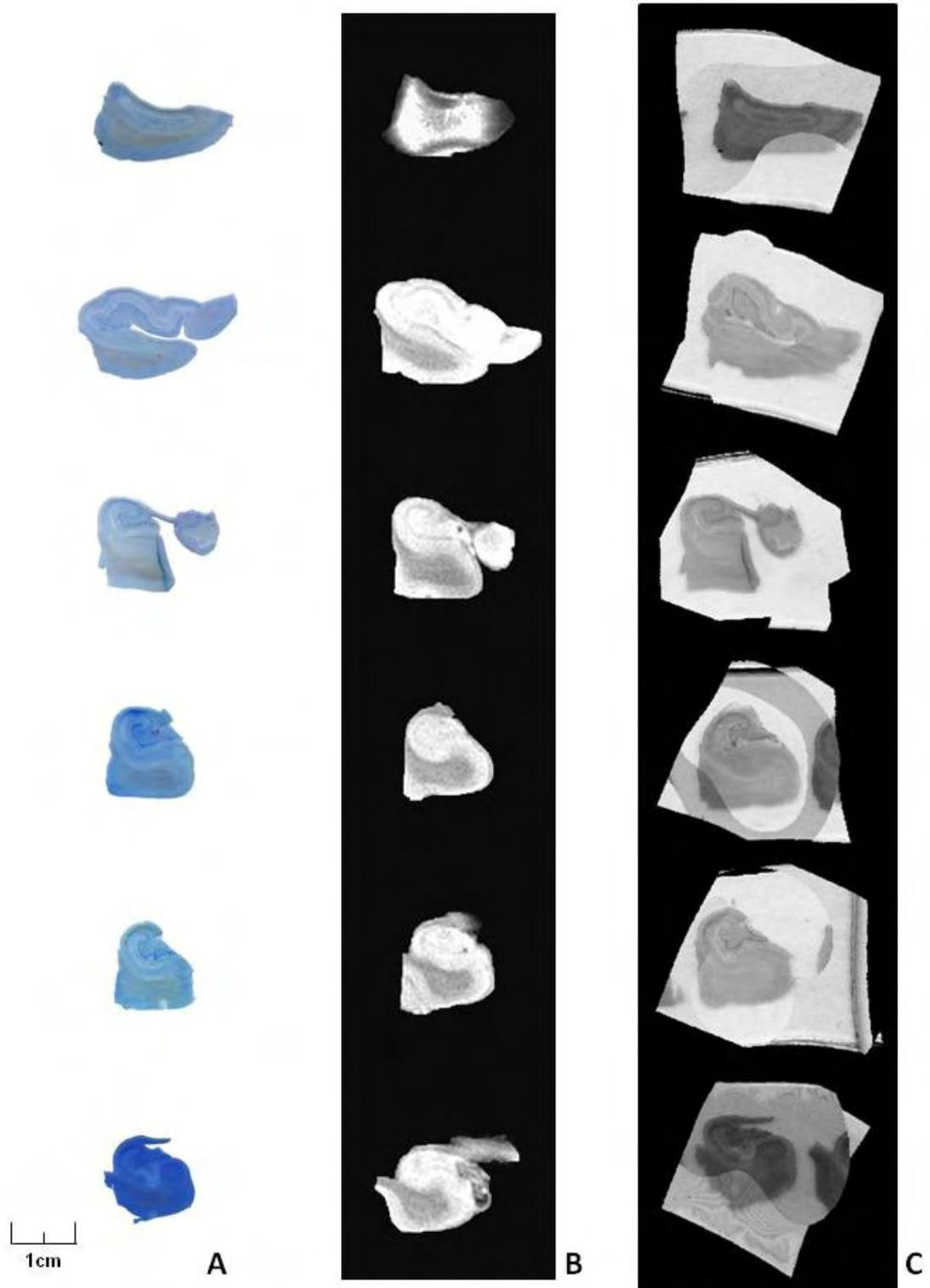


Figura 10: Demonstração do resultado da seqüência de interpolação histológica.
As imagens (A) seqüência histologia e (B) RM, e em C o resultado das fatias híbridas.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo demonstrar a possibilidade de se obter o co-registro entre imagens de RM 1,5T e imagens histológicas de hipocampos através de seus volumes 3D. Após a realização de uma serie de correções e adaptações do protocolo de aquisição de imagens, obtivemos um resultado bastante satisfatório. Foi possível observar uma correlação bastante precisa entre as imagens de RM e suas correspondentes na histologia em hipocampos controles e escleróticos.

Nas últimas duas décadas, o registro de imagens médicas tornou-se uma área de investigação importante por suas varias aplicações em estudos de população, de doenças, de imagens de fusão e de orientação de intervenção. O registro “multimodal” é um dos assuntos mais interessantes, pois abre o caminho para construções abrangentes e compreensão da estrutura anatômica normal e patológica através da integração de informações obtidas de diferentes aquisições de imagem (ZHAN, 2007).

Apesar dos métodos de registro “multimodal” de imagens ser extensivamente investigados, os estudos com registro de imagens histológicas tem sido muito limitados. Por exemplo, Taylor e col. (2004) propuseram um método para registrar imagens histológicas com imagens de ultra-sonografia através do delineamento manual das superfícies (histológica e ultra-som), que foram alinhadas utilizando um algoritmo de correlação 3D.

Alguns autores têm proposto técnicas de co-registro entre imagens de histologia e imagens de RM em animais pequenos, primatas e humanos. Schormann e col. (1995) propuseram uma abordagem, baseada em pontos de referência (“landmarks”), em que as imagens histológicas eram deformadas para coincidir com as imagens de RM. Os autores destacaram dois grandes problemas nesse protocolo: (I) a dificuldade em definir pontos de referência na histologia e (II) a necessidade de deformação da resolução das imagens histológicas para o co-registro com a baixa resolução das imagens de RM. Por outro lado, Zhan e col. (2007) utilizaram métodos automáticos para detecção de pontos de referência para o registro de tecido histológico de próstata de rato e imagens de RM. Sendo a cápsula externa da próstata uma estrutura homogênea, isso facilitou o encontro automático de pontos de referência. Já no processamento descrito por Meyer e col. (2006), o ponto fundamental foi a aquisição das imagens da face do bloco, fotografadas antes do tecido ser cortado pelo micrótomo. Essas imagens foram utilizadas para corrigir as deformações das fatias histológicas através de transformação de 2 dimensões (2D) por 7 pontos de referência, utilizando a informação mútua como a função objeto. Meyer e col. (2006) foram capazes de demonstrar, com poucos pontos de referência e afinidades lineares, um método pelo qual qualquer ponto na fatia histológica poderia ser mapeado de volta para seu correspondente na imagem de RM com menor tempo de processamento.

No presente estudo, foi optado pela utilização de pontos de referência manuais, colocados em pontos da cabeça, do corpo e da cauda do hipocampo. Nos tecidos controles, por terem as características anatômicas bem definidas, essas marcações ajudaram a interpolação das imagens com menos pontos de referência em relação aos

hipocampos escleróticos, nos quais o tecido apresentou problemas de preservação anatômica, necessitando de mais pontos de referência para obter o mesmo resultado dos controles.

Alguns estudos, como Toga e col. (1999), utilizaram cérebros inteiros congelados imediatamente após a morte. Nesse caso, os cérebros eram fatiados, corados e suas imagens eram deformadas elasticamente para o co-registro com as imagens obtidas *in vivo* dos exames de RM. Já Kenwright e col. (2003) utilizaram a técnica de co-registro rígido, tendo como resultado distorções não lineares entre as imagens. No presente estudo, foram utilizados hipocampos humanos dissecados, submetidos à RM antes do processamento histológico. Os processos de congelamento e corte do tecido introduziram distorções não lineares, aumentando o trabalho computacional, de maneira que as imagens histológicas tiveram que passar por uma deformação rígida para coincidirem com as imagens de RM.

A correção das deformações teciduais requer uma estimativa da configuração inicial de cada fatia para reconstrução do volume 3D pelo alinhamento da série de fatias. Assim, Dauguet e col. (2007), em seu estudo com encéfalos de babuínos, propuseram um protocolo para a correção dos volumes obtidos da histologia, utilizando pontos de referência nas faces do bloco de corte para o alinhamento das fatias dentro da estrutura.

Signh e col. (2008) realizaram o co-registro de imagens de RM e histologia em duas etapas. Primeiramente, os autores fizeram o co-registro da RM com a face de corte do bloco e, em um segundo momento, fizeram o co-registro da histologia com a

face de corte do bloco. Posteriormente, as imagens resultantes dessas etapas foram sobrepostas para a obtenção de um co-registro entre histologia e RM. O presente trabalho seguiu a mesma linha, mas utilizamos as fotos macroscópicas somente nas imagens histológicas para a correção de angulação.

Zarow e col (2004) desenvolveram um método que minimiza a distorção física e garante o alinhamento das fatias histológicas após o corte e manuseio do tecido cerebral. Nesse protocolo, o ponto fundamental é emblocar o cérebro em Agar, utilizando uma forma padronizada com hastes de orientação espacial. Esse método permite a reconstrução tridimensional do cérebro pós-morte que então é co-registrada com a RM obtida *in vivo*. Segundo os autores, esse método também poderia ser utilizado para material previamente fatiado.

De fato, o Agar fornece uma matriz semi-rígida e adequada para a incorporação de hipocampos e cérebros pós-morte, pois permite o contraste entre o tecido e a matriz circunjacente. Esse método produz fatias com espaçamento regular, o que não é obtido quando o corte é feito na peça sem agar, além de permitir o corte em vários planos (coronal, sagital, axial ou com orientação aleatória).

Grinberg e col. (2009), recentemente superaram várias limitações envolvidas nos estudos de correlação entre imagens de RM e achados histopatológicos em humanos. Os autores desenvolveram protocolos para reduzir as deformações dos encéfalos durante o processamento, incluindo: fixação por perfusão, inclusão em celoidina e corte de 400-440 μ m de espessura. A partir desse processamento, é

possível fazer reconstruções digitais 3D dos cortes histológicos, permitindo a correção de deformações não-lineares e o co-registro com as imagens de RM.

No presente trabalho, após a obtenção e fixação dos encéfalos, os hipocampos foram dissecados, emblocados em ágar, submetidos à RM e processados histologicamente em cortes de 60 μ m, que foram digitalizados e alinhados para a reconstrução digital do volume do hipocampo. Após isso, foi feito o co-registro dos volumes obtidos das imagens de histologia e RM, o que permitiu uma boa correlação ponto-a-ponto.

6. CONCLUSÕES

- 1- A técnica de co-registro descrita por Grinberg e col (2009) pôde ser adequada e aprimorada para hipocampos humanos isolados.
- 2- É possível determinar coordenadas espaciais comuns às imagens de microscopia e de RM, a fim de permitir a correlação ponto-à-ponto dos achados patológicos.
- 3- É possível realizar o co-registro de imagens obtidas por ressonância magnética e histologia em hipocampos controle e escleróticos.

REFERÊNCIAS

1. AMARAL, D. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**. 182:851-914, 1978.
2. ANDRADE-VALENÇA, L. P. A.; VALENÇA, M. M.; VELASCO, T. R.; LEITE, J. P. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose Hipocampal. **J Epilepsy Clin. Neurophysiol** v.12, n. 1, p. 31-36, 2006
3. ANDRADE-VALENÇA, L. P. A.; VALENÇA, M. M.; VELASCO, T. R.; CARLOTTI JR, C. G.; ASSIRATI, J. A.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; NEDER, L.; CENDES, F.; LEITE, J. P. Mesial temporal lobe epilepsy: Clínical neuropathologic finding of familial and sporadic forms. **Epilepsia** v.46, n.6, p. 1046-1054, 2008
4. ANDERSEN, P., MORRIS, R., AMARAL, D., BLISS, T., O'KEEFE, J. The Hippocampal Formation. in: Andresen, P.; Morris, R.; Amaral, D.; Bliss, T.; O'Keefe, J., eds., **The Hippocampus Book**. Oxford, Oxford University Press. pp. 3-8, 2007.
5. BLÜMCKE, I.; PAULI, E.; CLUSMANN, H.; SCHRAMM, J.; BECKER, A.; ELGER, C.; MERSCHHEMKE, M.; MEENCKE, H. J.; LEHMANN, T.; DEIMLING, A.; SCHEIWE, C.; ZENTNER, J.; VOLK, B.; ROMSTÖCK, J.; STEFAN, H.; HILDEBRANDT, M. A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. **Acta Neuropathol** n. 113, p. 235-244, 2007
6. CARRETE JUNIOR, H. Avaliação de Epilepsia por Neuroimagem Estrutural. Protocolos. **Rev. Neurociências** n.10, v. 2, p. 94-98, 2002

7. CASCINO, G. D.; JACK, C. R.; PARISI, J. E.; SHARBROUGH, F. W.; HIRSCHORN, K. A.; MEYER, F. B. Magnetic resonance imaging-based volume studies in temporal lobe epilepsy: pathological correlations. **Ann Neurol.** n. 30, p. 31-36, 1991
8. CENDES, F.; ANDERMANN, F.; GLOOR, P.; LOPES-CENDES, I.; ANDERMANN, E.; MELANSON, D. Atrophy of mesial structures in patients with temporal lobe epilepsy: cause or consequence of repeated seizures? **Ann Neurol.** n. 34, p. 795-801, 1993a.
9. CENDES, F.; ANDERMANN, F.; DUBEAU, F.; GLOOR, P.; EVANS, A.; JONES-GOTMAN, M. Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: na MRI volumetric study. **Neurology** n. 43, p. 1083-1087, 1993b
10. CENDES, F. ANDERMANN, F. Epilepsia de lobo temporal: estudo volumétrico da amígdala e hipocampo. In: GUERREIRO, C.A.M.; GUERREIRO, MM. (Eds). **Epilepsia**, São Paulo: Lemos Editorial, p. 89-94, 1996
11. CENDES, F.; KOBAYASHI, E. Epilepsia de lobo temporal. In: GUERREIRO, C.A.M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. (Eds) **Epilepsia** São Paulo: Lemos Editorial, p. 201-213, 2000
12. CENDES, F., Febrile seizures and mesial temporal scleroris. **Curr opin Neurol.** n. 17, p. 161-164, 2004
13. CUKIERT, A.; BURATINI, J. A.; MACHADO, E.; VIEIRA, J.; FORSTER, C.; ARGENTONI, M.; BALDAUF, C. .I. Seizure-related outcome after corticoamygdalahipocampectomy in patients with refractory temporal lobe epilepsy and

- mesial temporal sclerosis evaluated by magnetic resonance imaging alone. **Neurosurg Focus** v. 13, n. 4, ecp. 2, 2002.
14. DAUGET, J.; DELZESCAUX, T.; CONDÉ, F.; MANGIN, J.F.; AYACHE, N.; HANTRAYE, P.; FROUIN, V. Three-dimensional reconstruction of stained histological slices and 3D non-linear registration with in-vivo MRI for whole baboon brain. **Journal of Neuroscience Methods** n. 164, p. 191-204, 2007
15. DIEGUES, M. E. M.; PELLINI, M. P.; ALVES-LEON, S. V.; DOMINGUES, R. C. Avaliação de Foco Epileptogênico do lobo Temporal: Correlação entre SPECT ICTAL, Ressonância Magnética e Ressonância Magnética com Espectroscopia de Prótons. **Radiol Bras.** v. 37, n. 1, p. 1-7, 2004
16. DUNCAN, J. S.; BARTLETT, P.; BAKER, G. J.; Technique for measuring hippocampal T2 relaxation time. **AJNR Am J Neuroradiol.** n. 17, p. 1805-1810, 1996
17. DUVERNOY, H. M.; Brain anatomy. In: Kuzniecky RI, Jackson GD (eds.). Magnetic resonance in epilepsy. **New York: Raven Press**; p. 49-106, 1995
18. DUVERNOY, H. M. **The Human Hippocampus.** 3^a ed., Berlin, Springer-Verlag, 2005.
19. EL FALOUGY, H., BENUSKA, J. History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. **Bratisl Lek Listy**, 107: 103-106, 2006.
20. ERIKSSON, S. H.; FREE, S. L.; THOM, M.; HARKNESS, W.; SISODIYA, S. M.; DUNCAN, J. S. Reliable Registration of Preoperative MRI with Histopathology after Temporal Lobe Resections. **Epilepsia.** v. 44, n. 10, p. 1646-1653, 2005

21. ERIKSSON, S. H.; FREE, S. L.; THOM, M.; MARTINIAN, L.; SYMMS, M. R.; SALMENPERA, T. M.; McEVOY, A. W.; HARKNESS, W.; DUCAN, J. S.; SISODIYA, S. M. Correlation of quantitative MRI and neuropathology in epilepsy surgical resection specimens – T2 correlates with neuronal tissue in gray matter. **Neuroimage**. v. 37, n. 1, p. 48-55, 2007
22. FAHRNER, A.; KANN, G.; FLUBACHER, A.; HEINRICH, C.; FREIMAN, T. M.; ZENTNER, J.; FROSTSCHER, M.; HASS, C. A. Granule cell dispersion is not accompanied by enhanced neurogenesis in temporal lobe epilepsy patients. **Experimental Neurology** n. 203, p. 320–332, 2007
23. FRENCH, J. A.; WILLIMSON, P.D.; THADANI, V.M.; DARCEY, T. M.; MATTSON, R. H.; SPENCER, S. S. Characteristics of temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. **Ann Neurol**, n.34,p. 774-780, 1993.
24. GATES, J. R.; CRUZ-RODRIGUES, R. Mesial temporal sclerosis: pathogenesis, diagnosis, and management. **Epilepsia** n. 31, suppl. 3, p. S55-S66, 1990
25. GRAY, H. Anatomia, 35ª Edição, Editora Guanabara koognan, Rio de Janeiro, 1988
26. GRINBERG, L. T.; HEINSEN, H.; Computer-assisted 3D reconstruction of the human basal forebrain complex. **Dementia & Neuropsychologia** n. 2, p. 140-146, 2007
27. GRINBERG, L. T.; FERRETTI, R. E.; FARFEL, J. M.; LEITE, R.; PASQUALUCCI, C. A.; ROSEMBERG, S.; NITRINI, R.; SALDIVA, P. H.; FILHO, W. J.; BRAZILIAN AGING BRAIN STUDY GROUP.. Brain bank of the Brazilian aging brain study group - a

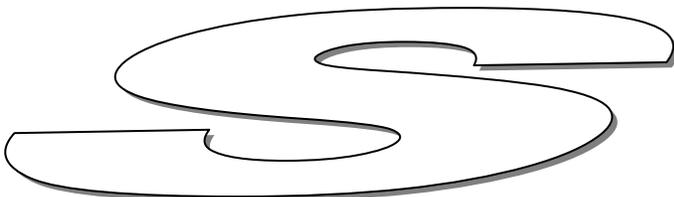
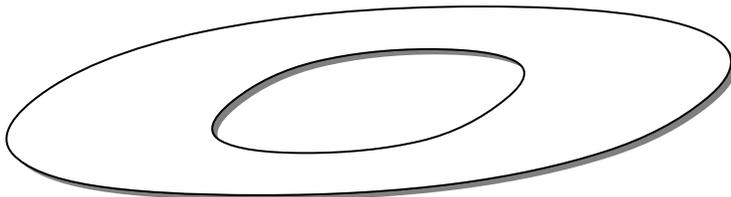
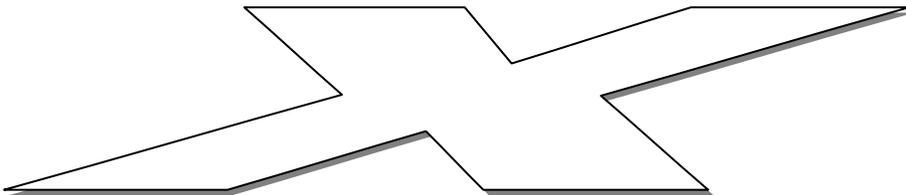
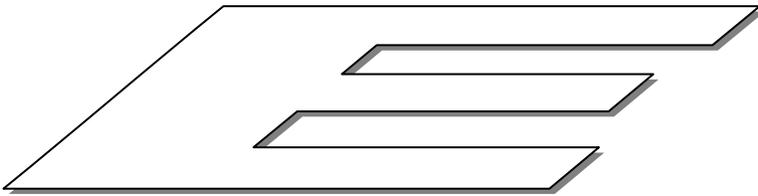
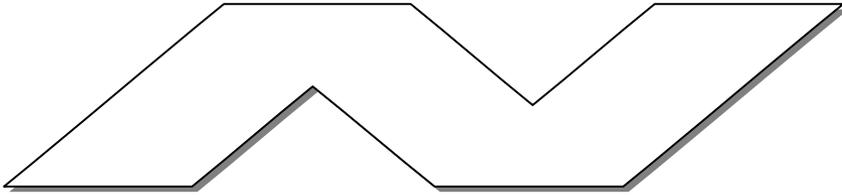
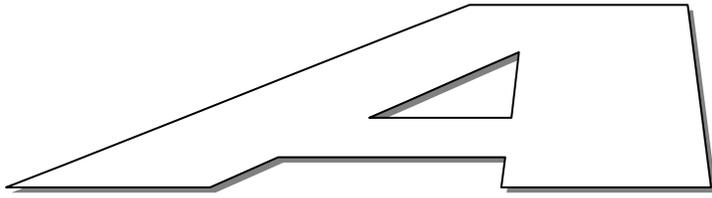
- milestone reached and more than 1600 collected brains. **Cell Tissue Banking** v. 8, n. 2, p. 151-162, 2007.
28. GRINBERG, L. T.; AMARO JUNIOR, E.; DA SILVA, A. V.; DA SILVA, R. E.; SATO, J. R.; DOS SANTOS, D. D.; DE PAULA PACHECO, S.; DE LUCENA FERRETTI, R. E.; PARAIZO LEITE, R. E.; PASQUALUCCI, C. A.; TEIPEL, S. J.; FLATZ, W. H.; BRAZILIAN AGING BRAIN STUDY GROUP; HEINSEN, H. Improved detection of incipient vascular changes by a biotechnological platform combining post mortem MRI in situ with neuropathology. **J. Neurol Sci.** 15; 283 (1-2): 2-8, 2009
29. GUEDES, F. A.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; LEITE, J.P.; Plasticidade neuronal Associada à Epilepsia do Lobo Temporal Mesial: Insigths a partir de Estudos em Humanos e em Modelos Animais. **J Epilepsy Clin. Neurophysiol** v.12, n. 1, p. 10-17, 2006.
30. GUERREIRO, C. A. M.; GUERREIRO, M. M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. Considerações gerais. In: GUERREIRO, C. A. M.; GUERREIRO, M. M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. (Eds.). **Epilepsia**. São Paulo: Lemos Editorial, p. 1-10, 2000
31. INSAUSTI, R., AMARAL, D. Hippocampal Formation. in: Paxinos, G.; Mai, K.J., eds, **The Human Nervous System**. 2^a ed. Chile, Elsevier Academic Press, pp. 871-914, 2004
32. JACKSON, G. D.; CONNELLY, A.; DUNCAN, J. S.; GRUNEWALD, R. A. Detection of hippocampal pathology in intractable partial epilepsy: increased sensivity with quantitative magnetic resonance T2 relaxometry. **Neurology**. n. 43, p. 1793-1799, 1993

33. JUNIOR, M. A. C. M.; GOYANNA, F.; MATOS, A. S.; BARBOSA, V. A. O.; VIEIRA, L. C.
Uso da seqüência FLAIR-EPI na análise da Esclerose Mesial Temporal. **Arq. Neuropsiquiatr.** v. 59, n. 2-A, p. 210-213, 2001
34. KENWRIGHT, C.; BARDINET, É.; HOJJAT, S.A.; MALANDAIN, G.; AYACHE, N.; COLCHESTER, A. C. F. 2-D to 3-D refinement of postmortem optical and MRI co-registration. *MICCAI, LNCS n. 2879*, p.935–944, 2003.
35. KUZNIECKY, R. I. MRI in cerebral developmental malformations and epilepsy. **Magn Reson Imaging Review**, v. 13, n. 8, p. 1137-1145, 1995
36. LEE, N.; TIEN, R. D.; LEWIS, D. V.; FRIEDMAN, A. H.; FELSBURG, G. J.; CRAIN, B. Fast spin-echo, magnetic resonance imaging-measured hippocampal volume: correlation with neuronal density in anterior temporal lobectomy patients. **Epilepsia.** n. 36, p.899-904, 1995
37. LEN CZ, T.; MCCARTHY, G.; BRONEN, R. A.; SCOTT, T. M.; INSERNI, J. A.; SASS, K. J. Quantitative magnetic resonance imaging in temporal lobe epilepsy: relationship to neuropathology and neuropsychological function. **Ann Neurol.** n. 31, p. 629-637, 1992
38. LORENTE DE NO, R. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal fur Psychologie und Neurologie*; 1934; 46: 113-74.

39. MARGERION, J. H.; CORSELLIS, J. A. Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. **Brain** v. 89, n.3, p. 499-530, 1966
40. MEYER, C.R.; MOFFAT, B. A.; KUSZPIT, K.; BLAND, P. L.; CHENEVERT, T. L.; REHEMTULLA, A.; ROSS, B. D. A Methodology for Registration of a Histological Slide and *in vivo* MRI Volume based on Optimizing Mutual Information. **Mol. Imaging**. v. 1, n. 5, p. 16-23, 2006
41. OTANI, N.; NAWASHIRO, H.; FUKUI, S.; OOIWAGA, H.; OHSUMI, A.; TOYOOKA, T.; SHIMA, K.; GOMI, H.; BRENNER, M.; Enhanced hippocampal neurodegeneration after traumatic or kainate excitotoxicity in GFAP-null mice. **Journal of Clinical Neuroscience** n. 13, p. 934-938, 2006
42. PREUSSER, M.; LAGGNER, U.; HABERLER, C.; HEINZL, H.; BUDK, H.; HAINFELLNER, J. A.; Comparative analysis of NeuN immunoreactivity in primary brain tumours: conclusions for rational use in diagnostic histopathology. **Histopathology** n. 48, p. 438-444, 2006
43. ROGACHESKI, E.; MAZER, S.; RODRIGUES, D.; BITTENCOURT, P. R. M.; Análise visual e volumétrica por ressonância magnética das formações hipocâmpais em um grupo de pacientes com diagnóstico de epilepsia do lobo temporal. **Arq. Neuropsiquiatr**, v. 56, n. 3-A, p 419-428, PR, 1998
44. SANCHEZ, M.; BODAN, E. F.; LALLO, M. A.; SINHORINI, I. L.; DAGU, M. I. Z.; MAIORKA, P. C.; PEREIRA, L. S. V. D.; GRAÇA, D. L.; Marcação imuno-histoquímica

- da respotamacrofágica e astrocitaria no tronco encefálico de ratos wistar submetidos ao modelo gliotóxico do Brometo de etídio e tratados com ciclofosfamida. **Arq. Neuropsiquiatr**, v. 64, n 3-B, p. 787-793, 2006
45. SAWRIE, S. M.; MARTIN, R. C.; GILLIAM, F. G.; ROTH, D. L.; FAUGHT, E.; KUZNIECKY, R. Contribution of neuropsychological data to the prediction of temporal lobe epilepsy surgery outcome. **Epilepsia** n. 39, v. 3, p. 319-325, 1998.
46. SCHORMANN, T.; DABRINGHAUS, A.; ZILLES, K. Statistics of deformations in histology and application to improved alignment with MRI. **IEEE Trans Med Imaging**. n. 14, p. 25-35, 1995
47. SILVA, A. V.; CAVALHEIRO, E. A. Epilepsia: uma janela para o cérebro **MultiCiência**, Web, 01 out. 2004.
48. SILVA, A. V.; SILVA, A. C.; CARRETE JR, H. Fatores determinantes da viabilidade neuronal em fatias hipocampais de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial. **J. epilepsy clin. Neurophysiol.** v. 12, n. 3, p. 139-141, 2006
49. SILVA, A.V.; HOUZEL, J. C.; CROARO, I.; YACUBIAN, E. M. T.; STAVELE, J. N.; CENTENO, R. S.; CAVALHEIRO, E. A. Granular cell dispersion and bilamination: two distinct histopathological patterns in epileptic hippocampi? **Epileptic Disord.** v.9, n.4, p. 438-442, 2007
50. SINGH, M.; RAJAGOPALAN, A.; KIM, T. S.; HWANG, D.; CHUI, H.; ZHANG, X. L.; LEE, A. Y.; ZAROW, C. Co-registration of In-Vivo Human MRI Brain Images to

- Postmortem Histological Microscopic Images. **Int J Imaging Syst Technol.** v. 5-6, n.18, p. 325-335, 2008.
- 51.SOUZA, T. A. C.; VALLE, V.; CRISTÓFOLI, V.; PAGLIOLI, EDUARDO; PAGLIOLI, ELISEU. Epilepsia temporal: relato de caso. **Scientia medica**, porto Alegre v.16, n.2. abr/jun 2006
- 52.STANDRING, S. (ed). **Gray's Anatomy. The Anatomical Basis of Clínical Practice.** 39^a ed., Espanha, Elsevier, 2005.
- 53.TAYLOR, P.; POTER, B.; MADASDY, G.; DI SANT'AGNESE, P.; PASTEMACK, D.; WU, Z.; BAGGS, R.; RUBENS, D.; PARKER, K. Three-dimensional registration of prostate images from histology and ultesound. **Ultrasound Med Biol** n. 30, p. 161-168, 2004
- TOGA, A. W. An Introduction to brain warping. *Brain Warping*, Academic Press; San Diego: p. 1-26, 1999.
- 54.WALTHER, C. Hippocampal terminology: concepts, misconceptions, origins. **Endavour**, 22: 41-44, 2002.
- 55.ZAROW, C.; KIM, T.S.; SINGH, M.; CHUI, H. C. A standardized method for brain-cutting suitable for both stereology and MRI-brain co-registration. **Journal of Neuroscience Methods** n. 139, p. 209-215, 2004
- 56.ZHAN, Y.; OU, Y.; FELDMAN, M.; TOMASZEWSKI, J.; DAVATZIKOS, C.; SHEN, D. Registering Histological and MR Images of Prostate for Image – based Cancer Detection. **Acad Radiol.** v. 11, n. 14, p. 1367-1381, 2007



ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO FMUSP

ENTREVISTA CLÍNICA

NPROT

NSVO

Data da necropsia: ___/___/___

Data Óbito: _____ H. Óbito: _____ H. Necro: _____ ΔT Morte: _____ H Início Entrev: _____

Nome: _____ Idade: _____ DN: ___/___/___

Sexo: _____ Raça: B N P A Natural: _____ Proced: _____ Estado Civil: S C V A D Filhos: _____Escolaridade: _____ anos (_____) Destro CanhotoProfissão: do lar doméstica outros _____Situação: Ainda trabalhava Aposentado _____ a Ap por invalidez _____ a Outro _____**Informante** Parentesco: _____ Freq com o pcte: D S M _____ Cuidador primário: sim não NA

Escolaridade do informante: _____ Com quem residia: _____

Causa do Óbito: _____

Causas básicas/ achados clínicos: _____

Ocorreu o óbito: em casa logradouro público no hospital/ transferência/ APH: _____

HPMA: _____

AP: Nega ou desconhece qualquer antecedente patológico HAS DM DAC ICC (TF _____) Arritmia MP IVP/OAC IRC DLP TCE AVCi // h prévio? Há _____ a - sem seqüela com seqüela: cognitiva motora _____ AIDS Sífilis AO/ OP Dist Tireóide Bronquite/ Asma DPOC _____ Down Depressão Esquizofrenia Mania TOC D Parkinson Neoplasia _____ Internação Psiquiátrica _____ Tentativa de suicídio TTOs anteriores: Clínicos: _____ Cirúrgicos: _____ Não fazia tto ou acompanhamento médico atualmente Nunca foi ao médico: recusa/ sem acesso Sd demencial diagnosticada em vida: não sim Há _____ a Etiologia: _____ História compatível com Síndrome demencial: não simInício dos sintomas: lento súbito memória comportamento outro _____Curso: lento e progressivo rápido evolução em degraus curso flutuante**Função anterior à morte** Acuidades visual e auditiva preservadas ↓ acuidade visual olhos hipoacusia prótese Dentição preservada falhas dent/ anodontia uso de prótese dentária disfagia SNG/SNE/ GTS Sedentário Atividade física: doméstica caminhada trabalho outra _____ Freq _____/sem Andava: s/ auxílio c/ auxílio: pessoas parede/ móveis equipamentos auxiliares _____ Acamado _____ Amputações _____ Lesões cutâneas (úlceras) _____ Independente Dependente Tomava decisões sozinho Não tomava decisões Em que situações convivia com muitas pessoas _____

