

Valoración de cuerpos amiláceos en epilepsia refractaria

Evaluation of corpora amylacea in refractory epilepsy

García-Fernández, J.¹; García-Fernández, M. M.⁴; García-Fernández, M.¹; Acal-González, C.J.³; García-del-Moral R.²; Ríos-Pelegrina, R.M.²

¹ Universidad de Granada.

² Hospital Universitario San Cecilio, Instituto de Investigación Biomédica, Universidad de Granada.

³ Departamento de Estadística e Investigación Operativa e IEMath-GR, Universidad de Granada.

⁴ Hospital Universitario Son Espases, Palma, Islas Baleares.

Resumen

Objetivos: El objetivo de esta investigación es comprobar si existe relación entre la densidad de cuerpos amiláceos (CoA) y diferentes parámetros clínicos de la enfermedad. Comparar la valoración de CoA con la técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) frente a la tinción de PAS. Evidenciar si existe relación entre la densidad de CoA hipocampales y la sobreexpresión de nestina.

Métodos: Análisis histológico de muestras de 14 pacientes. Para el conteo de los CoA se utilizaron indistintamente los puntajes en bruto, así como los valores por grados en una escala semicuantitativa según los criterios de Cherian *et al.* Para medir la evolución postquirúrgica se utilizó la escala de Engel modificada.

Resultados: La proporción muestral que presenta CoA en el hipocampo concuerda con la proporción encontrada en diferentes estudios. Se han obtenido evidencias significativas para indicar que el conteo es distinto según el tipo de tinción, siendo mayor con la técnica del PAS. Se aprecia que la densidad de CoA en el hipocampo y corteza está relacionada directamente con su densidad en estructuras parahipocampales.

Con respecto a la edad de inicio, hay indicios de significación. Igualmente sucede con la evolución postquirúrgica. En relación con la duración de periodo de crisis, puede observarse que las variables son independientes.

Se ha encontrado una asociación directa entre la sobreexpresión de nestina y la densidad de CoA hipocampales.

Conclusiones: En pacientes con Epilepsia Refractaria (ER), se constata un frecuente acúmulo de CoA, siendo mejor su evaluación con la tinción del PAS.

Con respecto a la asociación entre la densidad de CoA y la edad de inicio de la enfermedad hay indicios de significación. Igualmente sucede con la evolución posquirúrgica.

Sería conveniente continuar con las investigaciones en este campo para contrastar el papel de los CoA en la ER.

Palabras clave: Epilepsia refractaria; Esclerosis Hipocampal; Cuerpos amiláceos.

Abstract

Objectives: The purpose of this study is to check whether there is or not a relationship between CoA density and different clinical parameters of the disease established. Compare the assessment of CoA with Hematoxylin-Eosin technique against PAS staining. It is also intended to check if it exists a relationship between hippocampal CoA density and Nestine overexpression.

Methods: Histological analysis of 14 patients. For the counting of the CoA, raw scores were used interchangeably, as well as discretized values on a semi-quantitative scale according to Cherian *et al.* criteria. The modified Engel scale was used to measure post-surgical evolution.

Results: The proportion of CoA in the hippocampus matches the proportion found in different studies: 64.3%. At $\alpha=0.05$, there is significant evidence to observe that the counting is different depending on the type of staining used in the slides. The average number of CoA is higher with the PAS. It is seen that the density of CoA in the hippocampus and cortex is directly related to its density in parahippocampal structures.

With regard to the relation between CoA density and age of onset, there are signs of significance. As well as in the post-surgical evolution.

With regard to the duration of the crisis period, was found that both variables are independent. Finally, it is observed that there is a direct association between Nestine overexpression and hippocampal CoA density.

Conclusion: In patients with Refractory Epilepsy (ER), CoA presence is commonly verified, with a better evaluation with PAS staining. Respectfully to the relation between CoA density and age of onset, there are signs of significance, as well as post-surgical evolution with the modified Engel scale. It would be convenient to continue with the investigations in this field to contrast the role of CoA in ER.

Keywords: Refractory epilepsy; Hippocampal sclerosis; Corpora amylacea.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más frecuentes en nuestro medio. Su prevalencia es de 14,87 casos por cada 1000 habitantes. En España unas 700.000 personas han padecido epilepsia a lo largo de su vida y aproximadamente 250.000 personas padecen una epilepsia activa (prevalencia de 5,79 casos por cada 1000) (1).

La epilepsia es una enfermedad con un gran impacto sobre la vida de los pacientes y sus familiares y con un elevado coste económico. Alrededor del 30% de las epilepsias no pueden ser controladas con fármacos. Son las denominadas epilepsias refractarias (2). En estos casos el tratamiento quirúrgico se constituye como alternativa al tratamiento farmacológico. La esclerosis hipocampal en los adultos y la displasia cortical focal en niños, suelen ser el sustrato patológico más frecuente en las muestras analizadas. Además, en alrededor de un 60% de los exámenes microscópicos de hipocampo suelen hallarse cuerpos amiláceos que se corresponden con acúmulos de microfilamentos degenerados de distinta naturaleza (gliales y neuronales) cuyo papel en la epilepsia temporal refractaria es controvertido (3-12). Los objetivos de este estudio consisten en comprobar si la proporción de pacientes con ER del presente estudio que presentan CoA, concuerda con estudios anteriores, así como comprobar si existe diferencia entre el conteo de los CoA mediante la tinción rutinaria de hematoxilina-eosina y mediante la tinción del PAS. También se pretende comprobar si existe asociación entre la presencia y densidad de CoA en las localizaciones típicamente estudiadas (hipocampo y corteza cerebral) con la presencia y densidad de CoA en diferentes localizaciones parahipocampales (amígdala, uncus y opérculo). Además se pretende evidenciar la existencia o no de una asociación entre la presencia y densidad de CoA y diferentes parámetros clínicos de la enfermedad (edad de inicio, duración de la enfermedad y evolución posquirúrgica). Por último se pretende comprobar si existe una relación entre la densidad de CoA hipocampales y la sobreexpresión de nestina.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio se incluyen muestras quirúrgicas obtenidas de 14 pacientes remitidas a los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Universitario San Cecilio y Virgen de las Nieves de Granada entre los años 2012 y 2014. Las muestras pertenecen a tóporo-amigdalectomía con hipocampotectomía total unilateral. Corresponden a hipocampo, estructuras parahipocampales (amígdala, uncus y opérculo) y corteza cerebral. El estudio de estas muestras fue aprobado por el comité de ética.

Fijación y procesado macroscópico de las muestras

Las muestras se recibieron fijadas en formalina taponada al 10%, siendo procesadas en su totalidad las correspondientes a amígdala, opérculo y uncus. La inclusión del hipocampo se completó tras la realización de cortes seriados y orientados para la ejecución de cortes coronales, y de esta manera permitir la valoración de la estructura completa de giro dentado (GD), *cornu ammonis* (CA), subículo y corteza entorrinal.

Para la inclusión de corteza temporal se realizaron cortes perpendiculares a la superficie cortical y se seleccionaron aquellas secciones que macroscópicamente mostraron alguna alteración en la diferenciación de las sustancias gris y blanca, áreas de adelgazamiento de la sustancia gris u otras alteraciones macroscópicamente perceptibles. En los casos donde no se observó ningún área de interés se procedió a la inclusión completa del tejido.

Inclusión en parafina, corte, tinciones convencionales e inmunohistoquímica

Una vez obtenidas las secciones macroscópicas, su inclusión en parafina se realizó en un procesador automatizado de tejidos (Excelsior TS, ThermoScientific, Waltham, MA USA 02451) según procedimiento estándar, seguido de confección de bloques y realización de secciones en micrótomos Microm HM 340E (MicromGmbH, Walldorf, Germany) a 4 micras de espesor, que fueron coloreadas rutinariamente con HE y tinción del PAS según protocolo estándar para su observación. También se realizaron tinciones inmunohistoquímicas de marcadores NeuN para evaluar cuantitativamente la pérdida neuronal en hipocampo, y nestina (como parte de estudios previos de esta muestra).

Digitalización y visualización de cortes histológicos

Las preparaciones fueron escaneadas con Philips Ultra Fast Scanner (UFS) y se visualizaron y tomaron fotografías con Image Management System (IMS).

Evaluación de los cuerpos amiláceos

En cada muestra, se revisó de forma global y se hizo el conteo en 5 campos de gran aumento (CGA), correspondientes a un área de 16 mm² en los "puntos calientes" (Figura 1). Después se hizo una media aritmética entre esos 5 campos para determinar el número medio de cuerpos amiláceos por CGA.

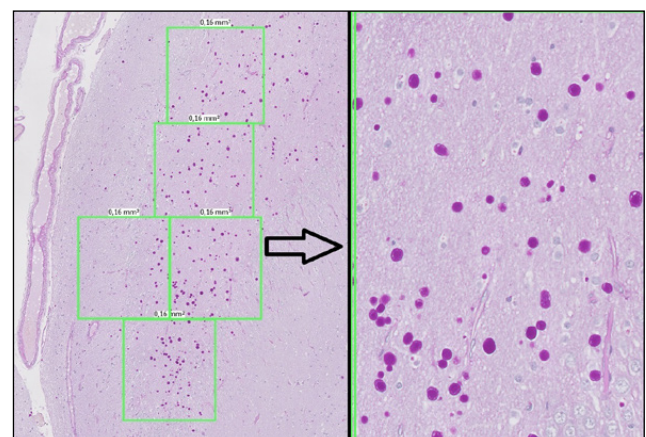


Figura 1. Delimitación de 5 campos de gran aumento para el conteo de CoA. PAS x 5. (izquierda). Imagen microscópica a gran aumento donde se visualizan cuerpos amiláceos bajo tinción de PAS (derecha).

Se realizó tanto el conteo en bruto, como por grados según la escala semicuantitativa de Cherian *et al.* (3). Ésta clasifica las muestras en cuatro grados según la cantidad de cuerpos amiláceos que presente de la siguiente manera:

- Grado 0: sin cuerpos amiláceos.
- Grado 1: de 1 a 5 cuerpos amiláceos por campo.
- Grado 2: de 6 a 10 cuerpos amiláceos por campo.
- Grado 3: más de 10 cuerpos amiláceos por campo.

Evaluación posquirúrgica

Se hizo una valoración de los resultados de la cirugía en cuanto al control de crisis siguiendo la clasificación de Engel modificada (13), agrupando a los pacientes según la clase numeral a la que pertenecían.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado mediante el software SPSS, versión 24.0 y con el programa estadístico R Core Team 2019.

RESULTADOS

De los 14 pacientes que formaron parte de este estudio, se conocía información suficiente para clasificarlos en las dos categorías: Que presentan cuerpos amiláceos en el hipocampo y los que no presentan. El 64.3% de los pacientes presentaron cuerpos amiláceos en el hipocampo.

Con el fin de estudiar si hay diferencias entre el conteo de CoA mediante la tinción rutinaria (HE) y a través de la tinción del PAS, se ha realizado para cada localización considerada el test de Wilcoxon para muestras dependientes. Previamente se ha estudiado el supuesto de normalidad mediante el test de Shapiro Wilks, siendo el resultado de la prueba en todas ellas significativo ($P < 0.05$).

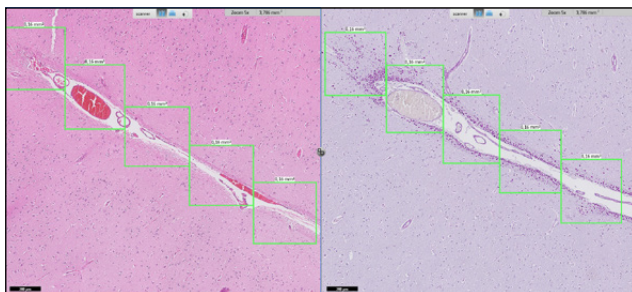


Figura 2. Comparación de dos cortes seriados de un mismo bloque, donde se puede observar a la izquierda con la tinción de Hematoxilina-Eosina, y a la derecha con la tinción del PAS. Los cuerpos amiláceos en la tinción de HE aparecen con un tono grisáceo, mientras que con la tinción del PAS adquieren un color magenta.

En la Tabla 1 figuran los valores p asociados al test de Wilcoxon, así como el tamaño del efecto relativo para cada test. También se muestra la media y la desviación típica ($media \pm d.t.$). Notar que para un paciente, fue imposible medir el número de cuerpos amiláceos en la amígdala, por ello en la Tabla 1 aparece para este test $n=13$. En consecuencia, tomando el nivel de significación habitual $\alpha=0.05$, se encontraron evidencias significativas en los datos para deducir que el número medio de cuerpos amiláceos en el hipocampo, corteza, amígdala y uncus es distinto según se considere HE o PAS, siendo mayor el número medio de cuerpos amiláceos encontrados con la técnica PAS. Además, puede considerarse que el tamaño de efecto de esta diferencia es relevante. Esto pone de manifiesto la importancia de utilizar la técnica PAS en la medición de cuerpos amiláceos, ya que es una tinción más específica para la detección de los CoA y, por tanto, su visualización y conteo es mucho más claro y sencillo.

Posteriormente, se ha valorado si existe relación entre la densidad de cuerpos amiláceos en el hipocampo y/o en la corteza con el resto estructuras parahipocampales analizadas, es decir, si presentar un mayor número de cuerpos amiláceos en el hipocampo/corteza, se traduce en tener más o menos cuerpos amiláceos en el resto de las localizaciones consideradas. Como se ha demostrado que la técnica PAS es más fiable para detectar cuerpos amiláceos, se han tomado los datos analizados por esta técnica para realizar el análisis. En la Tabla 2 se muestran los valores del coeficiente de correlación de Spearman y los valores P asociados al aplicar el test de independencia. Para el nivel de significación habitual ($\alpha=0.05$), se concluye que existe una fuerte y directa asociación entre el número de cuerpos amiláceos en el hipocampo y el número de cuerpos amiláceos en el resto de localizaciones. Esto significa que hay evidencias significativas de que a medida que aumente el número de cuerpos amiláceos en el hipocampo, aumentará también el número de cuerpos amiláceos en la corteza/amígdalas/uncus. Las mismas conclusiones pueden ser extendidas para la corteza, siendo aún más fuerte la relación existente.

Localización	HE (n=14)	PAS (n=14)	P	Tamaño de efecto.
Hipocampo	32.38 ± 37.34	54.47 ± 63.62	0.009	0.714 - [0.588;0.823]
Corteza	10.59 ± 22.43	26.04 ± 53.54	0.022	0.633 - [0.436; 0.786]
Amígdala (n=13)	10.68 ± 18.23	16.53 ± 25.58	0.028	0.610 - [0.444; 0.754]
Uncus	19.69 ± 29.47	40.87 ± 58.10	0.028	0.588 - [0.428; 0.754]

Tabla 1. Media ± Desviación típica de cuerpos amiláceos en las distintas localizaciones consideradas según la técnica empleada. Valor P asociado al test de Wilcoxon para muestras independientes y el tamaño de efecto asociado (estimación puntual e intervalo de confianza al 95% de confianza).

	Corteza	Amígdala	Uncus
Hipocampo	0.905 (<0.001)	0.848 (<0.001)	0.834 (<0.001)
Corteza	---	0.961 (<0.001)	0.943 (<0.001)

Tabla 2. Valor del coeficiente de correlación Spearman entre las estructuras parahipocampales analizadas y, entre paréntesis, el valor P asociado al test de independencia.

Siguiendo con la metodología anterior se ha valorado la asociación de CoA hipocámpales en relación a criterios clínicos establecidos como pueden ser la edad de inicio de la enfermedad, el tiempo de duración de la crisis o la evolución posquirúrgica. Por un lado, el valor del coeficiente de correlación de Spearman y el valor p asociado al test de independencia entre el número de cuerpos amiláceos en el hipocampo y la edad de inicio de la enfermedad fueron 0.482 y 0.081, respectivamente. Por su parte, el coeficiente de correlación de Spearman entre el número de cuerpos amiláceos en el hipocampo y el tiempo de duración de la crisis fue 0.189, con un valor p de 0.517 para el test de independencia. Asimismo, para estudiar la relación con la evolución posquirúrgica usando la clasificación de Engel modificada se utilizó el conteo de los CoA en el hipocampo en una escala semicuantitativa según los criterios de Cheria. El hecho de considerar los valores por grados se debe a la naturaleza cualitativa de la variable 'evolución posquirúrgica' al emplear la clasificación de Engel modificada. En este caso se utilizó la generalización del test exacto de Fisher para tablas 2x2, siendo el valor p asociado 0.143. En consecuencia, se han encontrado evidencias significativas para asumir que las variables son independientes entre sí, pero existen indicios de asociación entre el número de cuerpos amiláceos en el hipocampo y la evolución después de la cirugía.

Por otra parte tampoco se apreciaron atisbos de asociación entre el número de cuerpos amiláceos hipocámpales con el porcentaje de pérdida neuronal en ninguna de las zonas consideradas del *Cornu Ammonis*.

Finalmente, se comprobó la relación entre la sobreexpresión de nestina y la presencia y densidad de CoA hipocámpales. Considerando el grado de CoA, el resultado del valor p del test exacto de Fisher fue de 0.044, lo que implica que al nivel de significación habitual $\alpha=0.05$, se está en condiciones de afirmar que existe asociación entre el número de cuerpos amiláceos en el hipocampo y la sobreexpresión de nestina. La asociación parece que se debe al hecho de que cuando los pacientes presentan nestina, también presentan cuerpos amiláceos. Esta afirmación es corroborada tras realizar el test exacto de Fisher considerando la simple presencia o no de cuerpos en el hipocampo. Es decir, siendo el valor p asociado igual a 0.031, se observa que existe asociación entre la presencia de cuerpos amiláceos en el hipocampo con la presencia de nestina. De hecho, si se calcula el valor del riesgo relativo se comprueba que es 2.667, lo que significa que la probabilidad de presentar cuerpos amiláceos en el hipocampo es 2.667 veces mayor en pacientes que presentan nestina frente los que no presentan. El intervalo de confianza del riesgo relativo al 95% de confianza es [1.09;6.52].

DISCUSIÓN

Las muestras obtenidas de la cirugía en las intervenciones de la ER, pueden ser una gran fuente de información para ayudar a conocer sobre las causas de la enfermedad y el pronóstico de este tipo de pacientes. Se puede observar que la epilepsia refractaria está relacionada con un aumento de la cantidad de cuerpos amiláceos (64.3% de los pacientes presentan cuerpos amiláceos en el hipocampo), siendo este resultado concordante con la proporción encontrada en diferentes publicaciones de alrededor de un 60%. (3-7). Además la tinción de elección para su visualización y conteo debe ser la técnica del PAS, tras haber encontrado diferencias significativas respecto a la tinción de HE. Sería interesante tener en cuenta para futuros estudios sobre este mismo tema, una valoración en bruto del número de CoA, ya que al agrupar los valores por grados según la escala semicuantitativa de Cheria *et al.* (3) puede estar perdiéndose información valiosa a la hora de sacar conclusiones estadísticas.

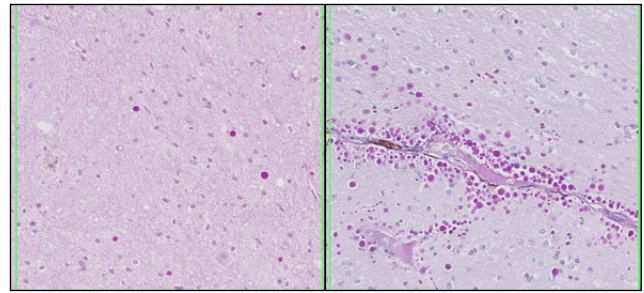


Figura 3. Imágenes correspondientes a campos de gran aumento. Pese a que se puede observar a simple vista que la derecha tiene un número muy superior de CoA, ambas muestras están clasificadas como grado 3 según la clasificación de Cheria *et al.*

Parece claro que la aparición de cuerpos amiláceos no es un proceso aislado en las localizaciones típicamente estudiadas (hipocampo y corteza cerebral), sino que se ha observado que se encuentran en estructuras parahipocámpales (uncus, amígdala y opérculo) y que además se guarda una relación directa y fuerte entre la densidad de CoA en el hipocampo y la corteza, con el resto de localizaciones estudiadas.

También se muestra en este estudio, que existe una asociación entre la densidad de cuerpos amiláceos y la sobreexpresión de Nestina en el hipocampo, lo que puede abrir un campo de estudio que relacione estos filamentos intermedios con la génesis de estos cuerpos.

Aunque no se ha demostrado que un aumento del periodo de tiempo con crisis esté relacionado con la densidad de cuerpos amiláceos, la edad de inicio parece que sí pueda estar relacionada de forma directa al encontrarse en los resultados fuertes indicios de significación, de tal manera que sujetos donde la edad de aparición fue más temprana, parecen presentar menor número de cuerpos amiláceos. Sin embargo, en este apartado como en otros del presente estudio, la limitación en el tamaño muestral no ha permitido demostrar dicha asociación. Lo ideal sería estudiar la posible relación con un tamaño de muestra superior en próximos estudios. Ambos resultados parecen de alguna forma contrarios a los presentados por el estudio de Estupiñán-Díaz (12) en el que relaciona inversamente la edad de aparición de la enfermedad con la densidad de CoA en la superficie meníngea y relaciona la densidad de cuerpos amiláceos con la duración del periodo de crisis.

Con respecto a la evolución posquirúrgica, parece indicarse que pueda existir una asociación directa entre la densidad de cuerpos amiláceos y una peor evolución posquirúrgica.

Para finalizar, el estudio muestra un dato que no es acorde con otros estudios previos y con la idea ya afianzada de que la densidad de cuerpos amiláceos y la densidad de pérdida neuronal son variables directamente relacionadas. En este estudio se observa que no existe relación entre la densidad de CoA y la pérdida neuronal. Sin embargo, haciendo una revisión pormenorizada de los datos, se apreció que tal falta de relación podría estar causada por tres individuos muestrales que se comportaban de manera distinta a la habitual. Dado el pequeño tamaño muestral del que se disponía, esto influyó en la no significación (no relación) en los resultados. Por lo que no desvirtúa la idea de que la densidad de pérdida neuronal y la densidad de Cuerpos Amiláceos están directamente relacionadas.

El estudio de los cuerpos amiláceos puede ayudar a comprender las causas y mecanismos epileptogénicos. Además, podría llegar a ser, añadida al Electroencefalograma (EEG) y a las pruebas de neuroimagen, una herramienta más en la clasificación e incluso un marcador pronóstico en pacientes con Epilepsia Refractaria. Sería interesante empezar a utilizar valores brutos del conteo de cuerpos amiláceos en lugar de la escala semicuantitativa para optimizar la información y conclusiones que se puedan extraer de estudios posteriores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a D. Ángel Martínez Pérez (Estudiante Técnico Especialista de Anatomía Patológica y Citología), al equipo Técnico de Especialistas de Anatomía Patológica y a Paulina Kostrzewa (Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu) su colaboración en esta investigación.

El trabajo de Christian J. Acal ha sido subvencionado por la beca de doctorado FPU (18/01779) otorgada por el Ministerio de Ciencias, Innovación y Universidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Serrano-Castro PJ, Mauri-Llerda JA, Hernández-Ramos FJ, *et al.* Adult Prevalence of Epilepsy in Spain: EPIBERIA, a Population-Based Study. *The Scientific World Journal*. 2015;2015:602710.
2. Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *The New England Journal of Medicine*. 2000;342(5):314-319.
3. Cherian PJ, Radhakrishnan V, Radhakrishnan K. The significance of corpora amylacea in mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology India*. 2003;51:277-279.
4. Van Paesschen W, Revesz T, Duncan JS. Corpora amylacea in hippocampal sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 1997;63:513-515.
5. Erdamar S, Zhu ZQ, Hamilton WJ, *et al.* Corpora amylacea and heat shock protein 27 in Ammon's horn sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2000;59(8):698-706.
6. Das A, Balan S, Mathew A, *et al.* Corpora amylacea deposition in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy: A new role for an old gene?. *Indian Journal of Human Genetics*. 2011;17 Suppl 1(Suppl 1):S41-S47.
7. Ribeiro M de C, Barbosa-Coutinho L, Mugnol F, *et al.* Corpora amylacea in temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2003;61:942-945.
8. Nishio S, Morioka T, Kawamura T, *et al.* Corpora amylacea replace the hippocampal pyramidal cell layer in a patient with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2001;42:960-962.
9. Suzuki A, Yokoo H, Kakita A, *et al.* Phagocytized corpora amylacea as a histological hallmark of astrocytic injury in neuromyelitis optica. *Neuropathology*. 2012;32(6):587-594.
10. Thom M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2014;40(5):520-543.
11. Radhakrishnan A, Radhakrishnan K, Radhakrishnan VV, *et al.* Corpora amylacea in mesial temporal lobe epilepsy: Clinicopathological correlations. *Epilepsy Research*. 2007;74:81-90.
12. Estupiñán-Díaz, BO, Morales-Chacón, LM, García-Maeso I, *et al.* Cuerpos amiláceos en la neocorteza de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal y displasia cortical focal. *Neurología*. 2015;30(2):90-96.
13. Aberastury M, Comas B, García M, *et al.* Epilepsy surgery in children and adolescents: Report on 43 cases. *Cirugía de la epilepsia en niños y adolescentes: experiencia de 43 casos*. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 2016;114(5):458-463.