

Proiect de cercetare postdoctoral

PN II – PD 628/2010

Titlul proiectului

**Relația de predictibilitate evolutivă între activitatea
bioelectrică și comportamentul neuroimagic al
parenchimului cerebral la câinii epileptici**

Sinteza lucrării – etapa unica II/2011

OBIECTIVE

Studiul activității electrice encefalice la câinii epileptici

Studiul integrat al comportamentului electric al creierului la câinii epileptici

Pentru analiza integrată a activității electrice câinii epileptici au fost grupați în două loturi: epileptici idiopatici (EI – 9 câini) și câini cu epilepsie secundară (ES – 14 câini) la care au fost înregistrate potențialele evocate auditive ale trunchiului cerebral (BAER), cu unde medii (MLR) și cu unde lungi (SVR) precum electroencefalograma (EEG).

Tabel 1 – Pacienți cu epilepsie secundară investigați prin electrodiagnostic

Nr crt	Identificare	Diagnostic
1	Boxer, femelă, 12 ani	Gliom
2	Chihuahua, femela, 1 an	Hidrocefalie
3	Golden Retriever 10 ani	Gliom
4	Fox terrier, 12 ani	Metastaze cerebrale
5	Boxer, femelă, 10 ani	Gliom
6	Mops, femelă, 4 ani	Encefalită necrozantă
7	Husky, mascul, 4 luni	Hidrocefalie
8	Rasă comună, mascul, 7 ani	Encefalită distemper
9	Rasă comună, mascul, 1 an	Encefalită distemper
10	Bichon, femela, 2 luni	Encefalită
11	Caniche, mascul, 10 ani	Meningiom
12	Rasă comună, 2 luni	Hidrocefalie
13	Metis Peckinez, 7 ani	Encefalită granulomatoasă
14	Câine rasă comuna 12 ani	Encefalită uremică

Analiza potențialelor auditive evocate la câinii cu epilepsie idiopatică

Material și metodă

Traseele au fost înregistrate cu sistemul de electrodiagnostic Neuropack S, MEB 9400 K (Nihon Kohden) și cu ajutorul softului pentru electroencefalografie după tehnici prezentate anterior¹.

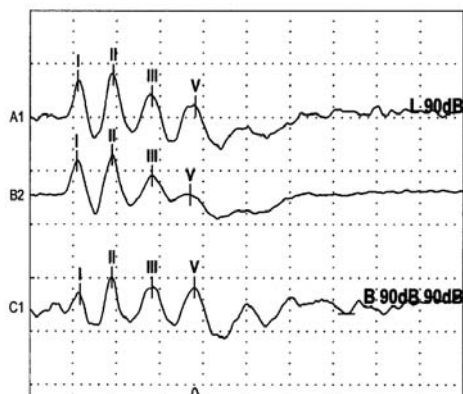
Rezultate

Analiza BAER. Traseele înregistrate au arătat un comportament bioelectric al trunchiului cerebral (TC) în general normal la câinii EI (9/9). Au putut fi identificate și marcate cu ușurință undele I-V care s-au caracterizat printr-o latență și morfologie caracteristică. (Fig.1). În cazul pacienților la care examinarea a fost realizată fără inducerea anesteziei generale (3/9), postictal s-a putut constata diminuarea amplitudinii undelor III și/sau V cu pierderea individualizării și realizarea unui traseu în platou (2/3), eventual cu prezența de unde suplimentare generate de structuri plasate între complexul olivar al TC și colicului caudali (1/3). (Fig.2). Acest aspect este interesant atâta vreme cât trunchiul cerebral nu intervine în geneza activității convulsive. Totodată SRA are o localizare difuză la nivelul trunchiului cerebral dar nu conține structuri care să interfereze activitatea structurilor nucleare implicate în geneza potențialelor evocate. Goncalves R. (2011)² descrie posibilitatea existenței unor structuri subcorticele talamice care ar putea avea proiecție în nucleii vestibulari ai trunchiului cerebral

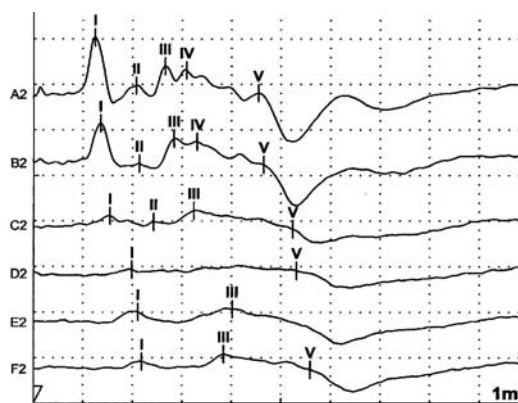
¹Musteață M. (2009, 2011) pentru BAER și MLR și în raportul de cercetare etapa I/2010 (SVR)

² Goncalves, R., I. Carrera, et al. (2011). "Clinical and topographic magnetic resonance imaging characteristics of suspected thalamic infarcts in 16 dogs." *Vet J* **188**(1): 39-43.

generând astfel deficite clinice vestibulare în condițiile unui trunchi cerebral intact morfofiziologic. Existența unei astfel de ipoteze permite explicarea alterării activității electrice a structurilor implicate în geneza BAER de către structuri cerebrale cu activitate electrică anormală demonstrate a fi implicate în geneza atacului epileptic.

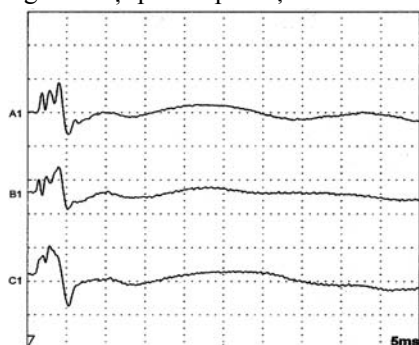


Traseu BAER la un pacient cu EI. Aspect normal

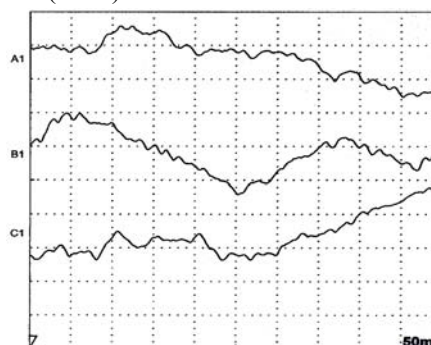


Traseu BAER (ureche dreaptă) la un pacient cu EI. Pierderea individualității undelor III - V cu apariția lor în platou. Apariția unor unde în salvă vizibile la stimularea cu 90 și 80 dB SPL (A2, B2)

Analiza MLR în cazul pacienților EI a relevat modificări majore ale morfologiei undelor doar la unii pacienți, în perioada postictală (3/3). S-a constatat reducerea până la anularea morfologiei undelor (1/3), de cele mai multe ori într-o manieră bilaterală. Traseele obținute arată o predispoziție a ariilor cerebrale temporale în geneza si/sau susținerea activității epileptice. Aspecte asemănătoare au fost înregistrate și pentru potențialele evocate cu latență mare (SVR).



Traseu MLR la un pacient cu EI. Stimulare la 80 dB SPL ureche stângă (A1), dreapta (B2) biuricular (C1). Aspectul caracteristic este pierdut, structurile nucleare determinând apariția unor unde cu amplitudine mică în condițiile unei stimulări maxime



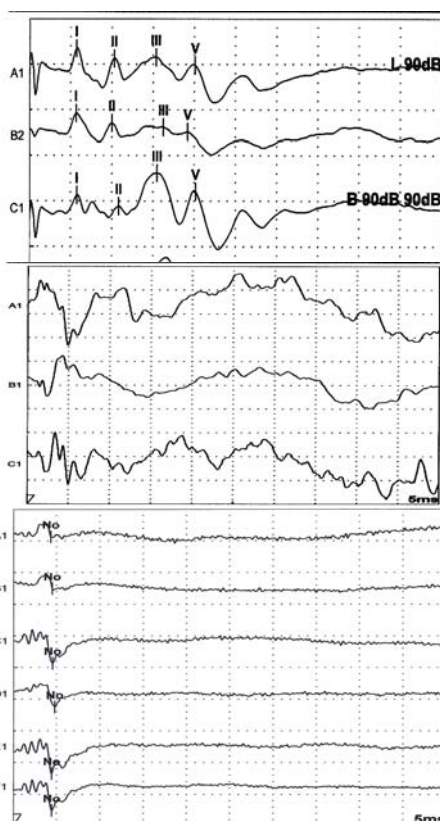
Traseu SVR la un pacient cu EI. Stimulare cu 80 dB SPL. Se constată pierderea aspectului normal al morfologiei undelor.

Urmărind datele prezentate mai sus putem aprecia că în cazul EI structurile cerebrale implicate în geneza potențialelor auditive evocate cunosc modificări îndeosebi pentru structurile ce nu sunt cuprinse în trunchiul cerebral (tractusurile de transmitere a informației de la coliculii caudali și aria auditivă corticală). Rar, au putut fi constatate modificări și la nivel BAER. Prezența modificărilor BAER la un pacient cu EI poate fi interpretată ca o expresie la distanță a alterărilor funcționale ale structurilor implicate în geneza și menținerea activității epileptice (ex. nucleii talamici).

Analiza potențialelor auditive evocate la câinii cu epilepsie secundară

La pacienții cu epilepsie secundară potențialele auditive evocate s-au caracterizat prin modificări majore ale morfologiei (12/14 cazuri, 85,71%) până la suprimarea undelor (2/14 cazuri,

14,28%). Modificările induse la nivelul MLR și SVR demonstrează caracterul invaziv al leziunii și efectul de masă imprimat de aceasta. Modificările MLR și SVR au urmărit fidel localizarea anatomică a leziunii. Pentru leziunile de la nivelul cortexului auditiv, paraventriculare (la nivelul tracturilor auditive) și la nivelul mezencefalului, MLR a fost întotdeauna modificat și nu s-a corelat cu extinderea lezională. Pentru leziunile plasate la nivelul celorlalte zone ale encefalului, modificările MLR și SVR s-au corelat doar în cazul unor leziuni mari ce imprimau un efect de masă pronunțat. Exprimarea BAER a fost alterată doar în patologiile caracterizate de creșterea masivă a presiunii intracraniene cu compresiunea indirectă asupra trunchiului cerebral (1 caz hidrocefalie, 2 cazuri gliom). În toate encefalopatiile generatoare de ES alterarea BAER s-a asociat cu un pronostic grav.



BAER la un Golden Retriever cu ES datorată unui neoplasm cerebral cu localizare temporoparietală dreaptă. Efectul de masă imprimat de tumoare a determinat modificări ale undelor III și V ipsilateral (scăderea amplitudinii undelor cu tendința de evoluție în platou; latența undelor a rămas normală)

MLR la același pacient. Pierderea arhitecturii undelor corespundente părții drepte (traseu B)

MLR la un pacient cu ES secundară hidrocefaliei. Absența undelor cu păstrarea nealterată a BAER.

Studiul electroencefalogrammei la câinii cu epilepsie

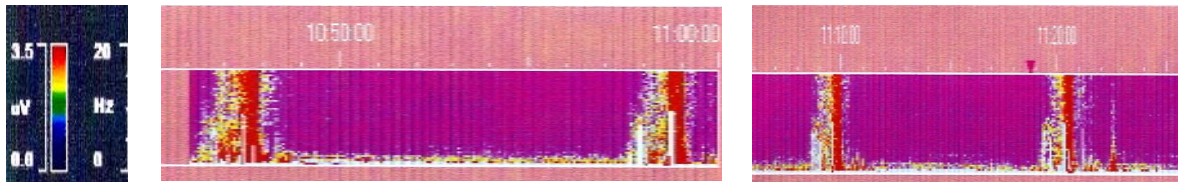
Electroencefalograma a fost realizată la toți pacienții cu EI și la 9 pacienți cu ES.

Tehnica de examinare:

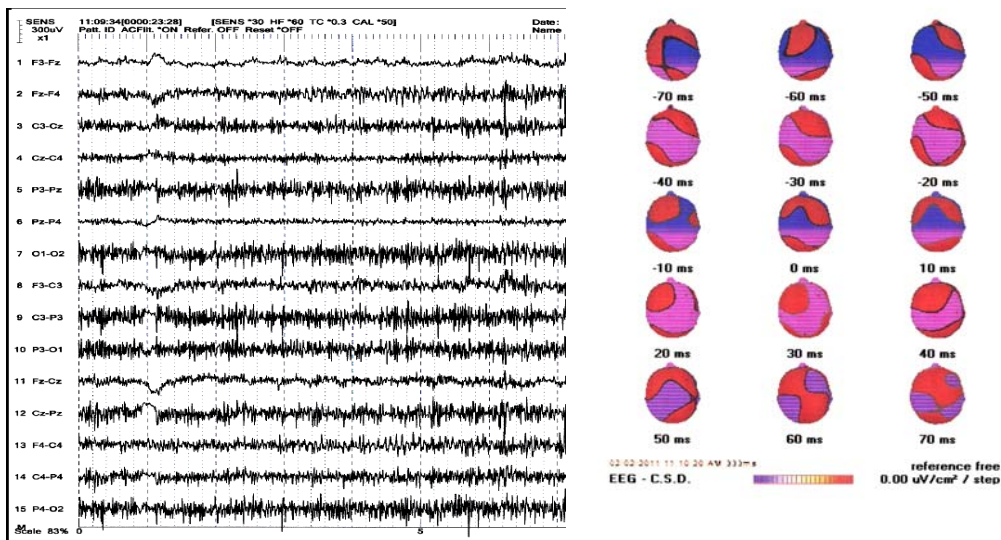
Pacienții au fost așezați în decubit sternoabdominal. Examenul a fost realizat cu ajutorul Softului EEG computerizat Nihon Kohden. Parametrii de înregistrare au fost: impedanța < 10 Ω, spectru de frecvență < 30 Hz, high cut 60 Hz, sensibilitate 3. Electrozii folosiți au fost de tip cupă și au fost aplicați pe suprafața scalpului după tunderea, degresarea și aplicarea unei paste adezive speciale sub anestezie generală indusă prin administrare de medetomidină inj.im. 0,03mg/kg (în măsura în care a fost posibil, examinarea a continuat până în momentul trezirii din anestezie), și la 3 cazuri fără anestezie Pentru fiecare pacient înregistrarea a fost pe o perioadă de minim 20 min. După înregistrare a fost analizat spectrul undelor capturate (DSA).

Tehnica de înregistrare a permis înregistrarea descărcărilor epileptice atât în cazul atacului convulsiv generalizat, cât și în cazul descărcărilor epileptice subclinice manifestate prin doar prin apariția unui eveniment electric de durată scurtă (sub 10 ms) înregistrat pe toate canalele.

Analiza spectrală a fost deosebit de utilă în evaluarea activității emisferelor cerebrale pe o perioadă mai lungă de timp. Atacul epileptic a fost vizibil pe analiza spectrală sub forma unor grupuri de unde de o amplitudine ridicată (peste 3.5 μV) cu o frecvență mare (peste 20 Hz), cu morfologie caracteristică.

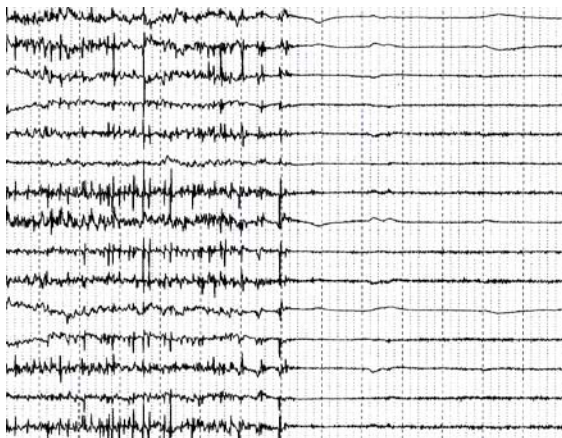


Analiza spectrală digitală la un pacient cu atacuri tonico clonice seriate. Inregistrare 30 min.



Aspecte EEG ale atacului convulsiv la un câine cu EI: faza tonică,

Propagarea atacului epileptic la nivel cortical



Aspecte EEG ale atacului convulsiv la un câine cu EI: faza tonico clonică și sfârșitul crizei. (stânga).

**Analiza morfoimagistică prin computer tomografie a encefalului câinilor epileptici
și
Analiza comparativă a rezultatelor imagistice ale parenchimului cerebral la câinii
epileptici.**

Tehnica de examinare

Au fost investigați 9 câini cu EI, 7 câini cu ES secundară unor procese lezionale cu efect de masă. Imaginile au fost comparate cu cele obținute anterior de la 8 câini fără simptomatologie neurologică și măsurătorile necropsice ale encefalului provenit de la 6 câini.

Fiecare animal a fost plasat, sub anestezie generală cu medetomidină 0,03 mg/kg inj im, în decubit sternoabdominal. Examenul CT a fost realizat nativ și după injectarea iv de substanță de contrast iodată în doză de 480 mg iod/kg cu o viteză de maxim 2 ml/s (Ohlerth S.,2007). Datele obținute au fost raportate la imaginile CT obținute de la 8 câini fără simptomatologie neurologică. Preluarea imaginilor a fost realizată în softul eFilm. Pentru analiza morfometrică au fost selectate secțiunile suprașelare din examinarea cu substanță de contrast care au fost apoi exportate și preluate în softul Adobe Photoshop CS3 pentru prelucrarea ulterioară. A fost marcat conturul cerebral și ventricular pentru fiecare secțiune pentru calcularea numărului de pixeli. Fiecare pixel din imagine a fost apoi transformat în cm² după formula:

$$\text{Aria} = \text{Nr. pixeli obținuți} \times (\text{DFOV}^2) / \text{dimensiunea matrice capturii CT}^2$$

După determinarea ariei cerebrale și a ariei ventriculare a fost determinat raportul ventricular exprimat procentual:

$$r = (AV/AC) \times 100$$

Pentru măsurătorile necropsice câinii au fost eutanasiați cu soluție T61® iar creierul a fost prelevat imediat și plasat în soluție de formaldehidă 10%. Secționarea creierului a fost efectuată după 24 de ore. Secțiunea a fost realizată la nivel suprașelar, cu punct de reper inserția hipofizară. Măsurătorile au fost realizate manual iar pentru calculul ariei s-a folosit formula $A = \pi \times I \times L$ unde I este înălțimea și L lățimea.

Pentru testarea omogenității valorile individuale obținute au fost comparate prin intermediul *testului t* cu prag de semnificație statistică $p < 0,05$. Valorile obținute au fost ulterior exprimate atât medie (AV) cu standard deviație (SEDV). Testarea ipotezei precum că o relație de corelație semnificativă există între valorile formațiunilor măsurate a fost determinat coeficientul de corelație *r Pearson*. Gradul de semnificație urmărit a fost de $r \square 0,7$ și $p \square 0,05$.

Rezultate:

Analiza statistică între dimensiunile ariei cerebrale globale obținute individual pentru fiecare câine au arătat un grad înalt de omogenitate a rezultatelor neînregistrându-se diferențe semnificative statistic ($p > 0,05$) între indivizii dintre subiecții cu EI, ES sau sănătoși. Valorile tuturor măsurătorilor efectuate (atât prin examen CT cât și prin cel necropsic) sunt prezentate în tabelul 2.

Datele obținute arată valori ale AC aflate în limite fiziologice ($15,66 \pm 2,01$ pentru CT și $12,51 \pm 0,83$ pentru necropsic) atât pentru câinii cu EI cât și pentru ES. ($p > 0,05$).

Tabel 2 – prezentarea comparativă a valorilor medii a măsurătorilor cerebrale obținute prin examen computer tomografic și examen necropsic. Valorile medii sunt prezentate cu standard deviație (SDEV)

	Aria cerebrală (cm ²)	Aria ventriculară (cm ²)	R
EI	14,41 ± 1,26	0,29 ± 0,04	2,06 ± 0,34
ES	14,68 ± 1,49	1,03 ± 0,16	7,03 ± 0,88
Normal	15,66 ± 2,01	0,28 ± 0,03	1,78 ± 0,24
Necropsic	12,51 ± 0,83	-	-

Analiza ariei ventriculare a relevat aspecte interesante cu privire la dinamica morfometriei cerebrale. Astfel la pacienții cu EI valoarea medie obținută a ariei ventriculilor cerebrali a fost de $0,29 \pm 0,04$ cm² cu un raport AV/AC de $2,06 \pm 0,34$. Raportul AV/AC a avut un grad ridicat de corelație directă ($r = 0,861$ respectiv $r = 0,766$) cu aria ventriculară fără a se corela cu aria cerebrală ($r = -0,370$ respectiv, $r = -0,132$). Aceste rezultate sugerează faptul că primele modificări ale morfologiei encefalului apar la nivelul sistemului ventricular caracterizându-se prin creșterea acestuia, similar hidrocefaliei *ex vacuo* (creșterea ventriculilor cerebrali cu scăderea volumului cortical la presiune intracraniană normală). Prin urmare în cazul EI instalarea atrofiei cerebrale globale poate fi urmărită prin aprecierea volumului ventricular mai degrabă decât prin aprecierea ariei cerebrale.

În cazul ES s-a înregistrat o arie ventriculară de $1,03 \pm 0,16$ cm² la o arie cerebrală de $14,68 \pm 1,49$ cu un raport AV/AC de $7,03 \pm 0,88$. Și în acest caz AC a fost statistic nemodificată comparativ cu lotul normal sau cu EI. Raportul AV/AC s-a corelat pozitiv cu AV ($r = 0,766$). Se remarcă valorile deosebit de mari ale AV/AC în cazurile leziunilor cerebrale cu efect de masă.

Analizând faptul ca pe imaginile CT în EI și ES nu au existat modificări ale AC dar au fost diferențe la AV și ținând cont că AV nu a putut fi măsurată obiectiv în examenul necropsic metodologia optimă de examinare a modificărilor de tip atrofic pe CT la câinii cu epilepsie trebuie să vizeze aspectul ventriculilor laterali. Raportul AV/AC surprinde modificări minore în volumul cerebral.

Concluzii:

- Potențialele auditive evocate sunt normale la câinii cu EI, singurele modificări fiind constatate doar în perioada postictală.
- Modificarea BAER la pacienții cu EI în perioada postictală poate fi expresia activității anormale a structurilor talamice (implicate în susținerea activității epileptice) în condițiile unui trunchi cerebral normal
- În ES modificările potențialelor evocate auditive au fost ipsilateral cu leziunea. Frecvent în ES, MLR și SVR cunoaște modificări spre deosebire de BAER la care modificarea morfologiei apare doar în cazurile avansate și sunt de prognostic grav.
- La pacienții epileptici raportul AV/AC a avut un grad înalt de corelație cu aria ventriculară mai degrabă decât cu aria cerebrală. Raportul AV/AC surprinde modificări minore în volumul cerebral, expresie a lărgirii ventriculilor cerebrali și instalarea unor fenomene tip hidrocefalie *ex vacuo* pentru pacienții din grupul EI sau a efectului de masă în cazul grupului ES.

Director proiect
Dr. Mihai MUSTEAȚĂ