

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
MESTRADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
NEUROCIÊNCIAS**

**MARCELO U. CRUSIUS**

**TRANSECÇÃO SUBPIAL MÚLTIPLA NA  
EPILEPSIA FOCAL EXPERIMENTAL**

**Porto Alegre  
Fevereiro 2009**

**TRANSECÇÃO SUBPIAL MÚLTIPLA NA EPILEPSIA  
FOCAL EXPERIMENTAL**

**Marcelo U. Crusius**

**Orientador: Doutor Jaderson Costa da Costa**

*Dissertação de Mestrado submetida ao Curso de  
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde –  
Concentração em Neurociências - da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.*

**Porto Alegre - RS**

**2009**



*A minha querida **Silvana**, que me  
impulsionou no meio acadêmico e sempre  
esteve ao meu lado revigorando minha alma.*

*Aos meus queridos e amados **Pedro e  
Mariana**, que vieram para trazer ainda mais  
amor e felicidade às nossas vidas.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, **Doutor Jaderson Costa da Costa**, pela incansável dedicação, atenção, criatividade e paciência, demonstrando-se objetivo e sábio com suas observações inteligentes, que enriqueceram este trabalho.

Aos **Professores da Pós-Graduação em Medicina da PUCRS** pelas aulas ministradas, que foram extremamente importantes para o meu aprimoramento intelectual e especialmente ao **Dr. Dolganov**.

A **Mariana Santos**, minha incansável companheira de trabalho.

Ao Dr. Paulo S. Crusius, **meu querido pai**, que sempre foi meu guia profissional, de homem e de pai; esteio nas horas difíceis e uma mão amada nas horas de calma. A **minha querida mãe Tita**, que sempre tem uma palavra de motivação ou um sorriso para me impulsionar à vida.

Aos meus **amados irmãos** Luciano, Cassiano e Mariano, por fazerem parte das conquistas por mim buscadas e por dividirem no dia-a-dia tristezas e alegrias.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>1.....</b>	<b>INT</b>
<b>RODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1. Tratamento cirúrgico das epilepsias: transecção subpial múltipla .....	16
1.2. Modelo experimental de epilepsia focal: penicilina subpial .....	21
<b>2.....</b>	<b>OBJ</b>
<b>ETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1.....	Objet
ivo Geral .....	22
2.2.....	Objet
ivos Específicos.....	22
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Animais.....	23
3.2. Delineamento experimental .....	23
3.3. Indução da epilepsia .....	24
3.4. Colocação dos eletrodos .....	25
3.5. Técnica cirúrgica experimental da TSM .....	26
3.6. Quantificação e monitorização das crises com vídeo-EEG.....	29
3.7. Análise da vascularização e organização estrutural do córtex cerebral pós-transecção subpial múltipla.....	31
<b>4.ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>33</b>

<b>5.RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>6.DISSCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
<b>7.CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>9.ANEXO (ARTIGO EM SUBMISSÃO).....</b>	<b>59</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Linha do tempo do experimento realizado .....	24
Figura 2 - Colocação dos eletrodos e injeção de penicilina na região da motricidade do membro anterior direito do rato .....	25
Figura 3 - Momento da transecção subpial múltipla com bisturi lâmina 11 .....	27
Figura 4 - O crânio de um rato e um encéfalo demonstrando os locais dos procedimentos realizados no experimento .....	28
Figura 5 - Traçado eletroencefalográfico e a videomonitorização sincronizadas .....	30
Figura 6 - Ilustração dos quatro canais registrados no eletroencefalograma (CH1, CH2, CH3 e CH4) .....	37
Figura 7 - Amostra de 30 segundos de EEG do registro basal (A), pós-injeção de penicilina (B), com atenuação do ritmo de base pós-TSM (C), após o retorno do ritmo de base e pós-TSM (D) .....	39
Figura 8 - Imagem histológica ampliada correspondente ao <i>slice</i> do Atlas Paxinos e Watson .....	45

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Classificação das crises epiléticas .....	15
Tabela 2 - Comparação e valor estatístico entre o grupo cirúrgico (intervenção) e o grupo de controle (Sham) .....	35
Tabela 3 - Valores em mediana das descargas interictais dos animais do grupo cirúrgico e de controle e o valor de p .....	41
Tabela 4 - Descargas interictais no grupo cirúrgico com medianas e valor de p .....	42
Tabela 5 - Descargas interictais no grupo de controle e o valor de p.....	42
Tabela 6 - Valores de mediana de descargas ictais no canal 3 nos registros pós-aplicação de penicilina e pós-TSM. Vê-se também o valor de p referente à comparação de valores pós-penicilina e pós-TSM .....	43
Tabela 7 - Mediana de descargas ictais dos registros basal e pós-aplicação de penicilina com valores de p .....	44



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**CH – canal de registo no EEG**

**DCF – displasia cortical focal**

**EEG – eletroencefalograma**

**Fa – área frontal anterior**

**Fl – área frontal lateral**

**Fm – área frontal medial**

**P – área parietal**

**i.p. – intraperitoneal**

**SDC – síndrome do córtex duplo**

**TSM - transecção subpial múltipla**

**UI – unidades internacionais**

**Video-EEG – videoeletroencefalograma**

**Pós-TSM – pós-transecção subpial múltipla**

**FUNDAMENTOS:** Epilepsia, por conceito, é a ocorrência de crises repetitivas na ausência de distúrbio tóxico-metabólico, decorrente de uma atividade elétrica anormal do encéfalo. Pode ser secundária, causada por lesão cerebral estrutural (tumores, áreas de gliose, malformações, etc.), ou decorrente de mutação genética com repercussão na excitabilidade neuronal. A maior parte das crises epiléticas responde bem ao tratamento medicamentoso; entretanto, 20-30% das epilepsias são refratárias ao tratamento medicamentoso. Estes pacientes são candidatos à cirurgia da epilepsia, a qual visa à ressecção da área de início das crises. Quando essa ressecção não é possível, como em áreas cerebrais eloqüentes, uma alternativa é o procedimento cirúrgico denominado de transecção subpial múltipla (TSM), que interrompe as conexões neuronais horizontais, reduzindo a propagação intracortical das descargas epiléticas ictais. **OBJETIVO GERAL:** Avaliar a eficácia da TSM no controle das crises epiléticas num modelo de epilepsia focal experimental. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foi realizado um estudo experimental com intervenção, no qual foram estudados 25 ratos machos da raça Wistar, com idade aproximadamente entre 60-150 dias, divididos em dois grupos e submetidos a implante de eletrodos de registro eletrencefalográfico e indução de foco epilético por injeção de penicilina G potássica cristalina subpial. No *Grupo I (Experimental)* os animais foram submetidos à craniectomia monitorados por vídeo-EEG por 10 minutos, induzidos ao foco epilético e videomonitorizados pelo mesmo período; após, foram submetidos à TSM e novamente videomonitorados por 10 minutos. No *Grupo II (Sham)*, os animais foram submetidos à craniectomia, submetidos por 10 minutos a vídeo-EEG; após, o foco epilético foi induzido, mas não foi realizada a

TSM, sendo novamente submetidos a 10 minutos de vídeo-EEG. Todos os animais foram submetidos a estudo histológico para avaliação da vascularização e da organização estrutural do córtex cerebral.

## **ABSTRACT**

### ***Multiple Subpial Transection in experimental model of focal epilepsy***

**Object.** *Epilepsy is an occurrence of repetitive crises in absence of toxic-metabolic disturb, causing from a brain abnormal electrical activity. It can be secondary, caused by cerebral structural lesion (tumors, gliosis areas, malformations etc), or from de genetic mutation with repercussion in neuronal excitability. The mayor part of epileptic crisis has a good response from medical treatment. However, 20-30% of epilepsy is refractory from medical treatment. Those patients are candidates to epilepsy surgery, who aim at resects areas where crisis start. When this resection is not possible like in eloquent area, an alternative is a surgical procedure called multiple subpial transection (MST), which interrupts the neuronal horizontal connections, getting down the intracortical propagation of ictal epileptic discharges. The goal in this study was valuate the efficacy of TSM in the control of crises in epilepsy focal experimental model.*

**Methods.** *We used 25 Wistar male rats, with 60-150 days of life, from Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, who seved like focal epilepsy model. The animals were kept under controlled illumination and temperature. After anesthetic procedure the animals were fixed in the stereotaxic apparatus and left craniotomy and Dura-mater were take out, than five electrodes were fixed at the cerebral cortex and video-electroencephalogram (video-EEG) were registered for 10 min. At this point we injected penicillin G potassic crystalline subpial in the same local to the most anterior electrode who was always in*

the forelimb motor cortex, than we registered 10 min video-EEG. After that procedure we divided in two groups: experimental group who we did a Multiple Subpial Trasection(MST) and a Sham group who we did not do MST, in both of that we registered 10 min video-EEG. **Results.** The time to get seizures had the same median in a surgical group and in the control group (180s). The rats which stopped crisis in the surgical group was 10 (66,7%) and in control group no one. Two animals (11,1%) died in a surgical group and 4(57,1%) in a control group. In the channel 3 the median post-TSM was 7(1 to 16) and in the end of register of control group 20 (6 to 35),  $p=0,012$ . For the interictal discharges in a surgical group the median post-penicillin against post-TSM was 17 ( $p<0,001$ ), in the control group was 14 post-penicillin and in the end of the register 20 ( $p=0,091$ ). Median in the surgical group for the post-penicillin was 1(0 to 6) and 0(0 to 1) ( $p=0,003$ ). For the ictal discharges in the surgical group the median post-penicillin was 1 and post-TSM was 0 ( $p=0,003$ ). There was not motor deficit after procedure in any animals; also there was no significant histological alteration in the rats. **Conclusion.** These findings suggest a role of MST stop or decrease tremendously the electrical spreading of epilepsy crisis in brain cortical layer of rats. It demonstrates that it is a very effective surgical therapy for refractory epilepsy focused on cerebral eloquent areas.

**KEY WORDS:** Epilepsy surgery, Multiple subpial transaction, cerebral eloquent areas

## 1. INTRODUÇÃO

Epilepsia, que muitas vezes é referida como crises convulsivas e algumas vezes é subdiagnosticada, é uma condição neurológica crônica comum, pois tem a prevalência de aproximadamente cinquenta milhões de pessoas no mundo, o que representa aproximadamente 1% da população geral, com idade de incidência mais comum entre os 18 e 65 anos de idade. <sup>1</sup>

A prevalência da epilepsia no Brasil é similar à de outros países subdesenvolvidos e a lacuna de tratamento é geralmente grande. A epilepsia é mais prevalente entre pessoas de baixo nível econômico e em pessoas mais idosas (acima dos 59 anos). Entretanto, a lacuna de tratamento é similar entre as classes sociais <sup>2</sup>

A patologia é caracterizada quando o paciente apresenta, no mínimo, duas crises convulsivas na ausência de doença tóxica e/ou metabólica, o que se caracteriza por febre e alterações hemodinâmicas e eletrolíticas. Pode também ser secundária, no caso causada por lesões cerebrais, como tumores intracranianos, malformações encefálicas, lesões cerebrais pós-traumáticas, distúrbios genéticos, tais como a esclerose tuberosa, cromossomo-20 em anel e doenças cerebrovasculares. Quando a epilepsia não tem causa conhecida, denomina-se epilepsia criptogênica; as idiopáticas são as epilepsias transmitidas geneticamente, com maior expressão em determinadas faixas etárias, como nos idosos, que representam aproximadamente 40% dos casos de epilepsias. <sup>1</sup>

Algumas situações precipitam ou são desencadeantes das crises convulsivas. Essas condições são, basicamente, a hiperventilação, o estímulo luminoso intermitente (fotostimulação), a privação do sono, o cansaço excessivo, a constipação, o período menstrual, o estresse e o consumo excessivo de álcool. As crises epiléticas são desencadeadas nos pacientes que, de alguma maneira, têm predisposição em tê-las, mas

não costumam ocorrer em indivíduos que passam pelas mesmas situações, porém não possuem predisposição para crises epiléticas.<sup>1</sup>

O tipo de crise convulsiva depende da área cerebral lesada e do grau de propagação. Quanto à propagação, as crises são classificadas clinicamente como focais, quando a descarga epilética se mantém num local, ou seja, não se propaga além do foco epilético, e generalizadas, quando os dois hemisférios cerebrais são atingidos pela descarga elétrica iniciada num foco ou local específico do cérebro. Os indivíduos com epilepsia podem apresentar diferentes graus de propagação e diferentes localizações do foco epilético, originando, assim, as diferentes crises epiléticas que constituem a base da sua classificação.<sup>1</sup>

As manifestações clínicas da crise epilética dependerão não só de onde a descarga se localiza como também da sua possível propagação para áreas cerebrais vizinhas. As crises epiléticas variam bastante na sua fenomenologia, podendo ser caracterizadas por perda da consciência, distúrbios do movimento, alterações sensitivas ou sensoriais e, ainda, por sintomas vegetativos e comportamentais. Podem ser tão rápidas que passam despercebidas ou tão prolongadas que exigem atendimento em emergência médica, podendo acarretar seqüelas graves. Crises que duram mais de trinta minutos, ou crises sucessivas sem recuperação do nível de consciência entre elas definem o chamado “estado de mal epilético”, que constitui uma das urgências neurológicas, especialmente na infância.<sup>3</sup>

As epilepsias são divididas, basicamente, em parciais, generalizadas e não classificáveis. As crises parciais são assim definidas por suas manifestações iniciais, clínicas e eletroencefalográficas e por serem provenientes de um foco específico no cérebro, limitando-se a um hemisfério cerebral. Ainda, podem ser seguidas de alteração

da consciência, por isso denominadas de “parciais complexas”; quando não há alteração da consciência, são denominadas de “parciais simples”.<sup>4</sup>

Por sua vez, as crises generalizadas são assim definidas por provocarem perda da consciência desde o início da crise; idiopáticas são as epilepsias transmitidas geneticamente, e criptogênicas, as epilepsias de presumível base orgânica, sem que se esclareça a etiologia.<sup>4</sup>

Na Tabela 1 apresenta-se o resumo da classificação das epilepsias proposta e validada em 1981 pela International League Against Epilepsy (ILAE), que é aceita como padrão internacional.<sup>5</sup>

**TABELA 1**  
**CLASSIFICAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS**

Crises Parciais, Generalizadas e Crises Não Classificáveis
<p><b>Crises Parciais (ou Focais)</b></p> <p><i>Crises Parciais Simples (cps)</i>            com sinais motores            com sinais sensitivos somato-sensoriais ou especiais            com sinais ou sintomas autonômicos            com sintomas psíquicos.</p> <p><i>Crises Parciais Complexas (cpc)</i>            início de crise parcial simples seguida por alteração da consciência            alteração de consciência no início</p> <p><i>Crises Secundariamente Generalizadas</i>            CPS evoluindo para crises tônico-clônicas generalizadas (CTCG)            CPC evoluindo para CTCG            CPS evoluindo para CPC e então para CTCG.</p>
<p><b>Crises Generalizadas (desde o início)</b></p> <p>CTCG Crises de ausência            Crises de ausência atípica            Crises mioclônicas            Crises tônicas            Crises clônicas            Crises atônicas.</p>
<p><b>Crises Não Classificáveis (informações incompletas ou inadequadas)</b></p>

Fonte: [http://www.epilepsia.org.br/epi2002/show\\_livro1.asp?cap=42](http://www.epilepsia.org.br/epi2002/show_livro1.asp?cap=42)

As crises epiléticas apresentam sinais e sintomas transitórios, em virtude da anormal e excessiva atividade neuronal sincrônica no cérebro, e são geralmente controladas com medicação. Entretanto, nos casos mais extremos, isto é, refratários ao tratamento clínico, o paciente necessita de tratamento cirúrgico para controle total ou parcial de suas crises.<sup>1,6</sup>

### **1.1. Tratamento cirúrgico das epilepsias: transecção subpial múltipla**

Dentre os vários tipos de cirurgia para epilepsia estão as amigdalohipocampectomias, que consistem na ressecção da amígdala e do hipocampo em pacientes com epilepsia mesotemporal. Rooyen et al., em 2006, demonstraram num estudo experimental que as descargas elétricas propagadas do hipocampo podem causar efeito a longa distância no córtex motor.<sup>7</sup>

Existem também as ressecções das lesões focais epileptogênicas, que podem determinar sinais deficitários e desencadear crises epiléticas refratárias ao tratamento clínico.

A transecção subpial múltipla (TSM) é um tipo de cirurgia de epilepsia que foi, primeiramente, descrito em 1969 por Frank Morrell e tem como objetivo principal tratar cirurgicamente os pacientes com epilepsia refratária que apresentem foco epilético em áreas eloqüentes com restrições à ressecção cirúrgica da lesão, causando mínimo ou nenhum déficit neurológico; pode ser realizada isoladamente ou como complemento à ressecção da lesão. Existe uma dificuldade para se avaliar a validade da TSM na epilepsia, pois seus resultados não podem ser comparados com controles, já que em muitos casos a TSM é realizada juntamente com a ressecção de lesão cortical.



A ressecção combinada com TSM é utilizada para tratar crises refratárias em córtex eloqüente e não eloqüente que tenha múltiplos focos, o que, segundo Devinsky et al., em 2003, parece melhorar o controle das crises epiléticas.<sup>8</sup> Entretanto, tem-se dificuldade de avaliar se a melhora das crises deve-se à TSM ou à ressecção seguida de TSM.<sup>6</sup> O princípio da TSM baseia-se na organização neuronal cortical, no seu padrão funcional e na atividade elétrica durante a propagação da atividade epileptógena. Como foi previamente demonstrado em gatos, o padrão de organização do córtex cerebral é orientado por colunas de células neuronais capazes de funções independentemente da atividade da sincronização e propagação horizontal das descargas epiléticas.<sup>9</sup> Assim, a unidade de atividade funcional é vertical e a propagação das crises epiléticas é horizontal. Por ser necessária mínima quantidade de contigüidade de córtex cerebral para manter sua atividade funcional, Morrell sugeriu a transecção subpial múltipla, que interrompe apenas a propagação horizontal.<sup>6</sup>

O procedimento consiste na delimitação das áreas epileptogênicas pela electrocorticografia. A técnica cirúrgica constituiu-se de coagulação com bipolar em pontos distantes aproximadamente 5 mm entre si nas bordas dos giros cerebrais. Assim, utilizando uma lâmina angulada para este procedimento (transector), realiza-se a transecção entre os pontos previamente coagulados.<sup>10</sup>

Kaufmann et al., em 1996, realizaram estudos neuropatológicos em oito pacientes, os quais foram submetidos à transecção subpial múltipla e, algum tempo depois, à lobectomia temporal para ressecção da lesão e estudo histológico dos resultados da TSM. Na maior parte dos casos, a técnica mostrou disjunção da propagação epileptogênica horizontal com lesão perpendicular ao córtex cerebral, mas num terço dos casos adicionou-se lesão profunda na área que dividia neurônios aferentes de

eferentes; também houve lesão na junção das substâncias branco-cinza, o que foi analisado como um fator de somação no controle das crises epiléticas.<sup>10,11</sup>

Quanto à recorrência tardia das crises epiléticas após a TSM, Orbach et al., em trabalho de 2001, sugerem que os maiores problemas da realização somente da TSM são o aumento da frequência e a recorrência tardia dessas crises. Em seu estudo avaliando e acompanhando 54 pacientes submetidos à TSM por um período médio de 56 meses, os autores verificaram que 79,6% deles tiveram redução significativa da frequência das crises; 50 % ficaram praticamente livres de crises e 18,6%, depois de mostrar uma melhora inicial, não só tiveram mantida como aumentou a frequência das crises por vários anos depois da cirurgia.<sup>12</sup>

Wyler et al., em 1995, relataram o caso clínico de seis pacientes com crises convulsivas parciais provenientes do córtex sensorio-motor, diagnosticadas por videoeletroencefalograma (vídeo-EEG) e mapeamento cortical transoperatório, nos quais realizaram TSM com uma modificação na técnica cirúrgica: a TSM foi realizada com o gancho da lâmina de epilepsia mais profundamente que a descrição cirúrgica original, para obter menor lesão aos vasos piais.<sup>13</sup> Dentre os resultados obtidos no estudo, quatro pacientes que não demonstravam anormalidades na RNM apresentaram gliose cortical na biópsia transoperatória. Apenas um paciente não apresentou melhora na frequência das crises, e testes neuropsicológicos realizados revelaram que os pacientes não demonstraram déficits pós-operatórios. Em conclusão, os autores propõem a hipótese de que esses pacientes representam a síndrome epilética central ou perirolândica, referindo-se à gliose cortical não demonstrada por imagem neurorradiológica.<sup>13</sup>

Estudos experimentais em animais que avaliam a TSM ou tentam esclarecer seu mecanismo e terapêuticas são limitados. Hashizume et al., em 1998, publicaram

resultados de um estudo que avaliou com EEG e medidas do metabolismo da glicose cerebral o efeito da TSM em ratos como modelos de epilepsia. Neste estudo, as crises convulsivas corticais focais foram induzidas pela injeção de ácido kaínico no córtex sensorio-motor esquerdo, atividade que se propaga além do córtex para áreas vizinhas e para o córtex sensorio-motor contralateral. No mesmo estudo foram realizadas cirurgias de TSM em torno da área cortical do foco epileptogênico, o que impediu a propagação da crise no hemisfério ipsilateral, mas não no contralateral. O metabolismo cerebral da glicose nos animais não foi alterado após serem submetidos à TSM. Esses resultados indicaram que a TSM suprime a propagação das crises acerca do foco cortical, mas não as interrompia no hemisfério contralateral, por não inibir completamente a interação vertical entre o foco e as áreas subcorticais. A preservação do metabolismo mensurado da glicose revelou que a função cortical na área da TSM fora preservada.<sup>14</sup>

Tanto a TSM como outros tipos de cirurgia podem ser utilizados como ferramentas para a melhora das crises da epilepsia intratável causada pela síndrome do córtex duplo (SCD), caracterizada por uma heterotopia neuronal laminar ou em banda, na qual uma camada extra de neurônios (substância cinzenta) localiza-se abaixo da camada normal do córtex cerebral. Em estudo multicêntrico, Bernasconi et al., em 2001, relataram oito casos de pacientes com SCD e epilepsia intratável. Os autores obtiveram resultados não satisfatórios com a ressecção focal da lesão, além de perceberem que a calosotomia oferecera uma melhora das crises dos pacientes, mas somente como tratamento paliativo. Concluíram também que seria necessário estudar um grupo maior de pacientes para poder confirmar a eficácia da TSM no tratamento cirúrgico da epilepsia intratável em pacientes com SCD, já que os dois pacientes tratados com TSM não apresentaram melhora significativa e as crises eram consistentemente localizadas.<sup>15</sup>

O controle do *status* epilético pode ter a TSM como ferramenta de auxílio, já que representa potencialidade fatal quando as crises não são controladas. Bristol et al., em 2006, relataram um caso de *status* epilético refratário a terapia medicamentosa, incluindo o uso de três drogas anti-epilépticas orais e ao coma induzido por barbitúrico. Os eletrodos de superfície localizaram vagamente o foco epilético no hemisfério cerebral esquerdo, razão por que foi colocada a placa de eletrodos subdurais para registro da atividade elétrica. As transecções subpiaais múltiplas foram realizadas subseqüentemente e o estado de mal epilético foi resolvido. Este caso ilustra a potencialidade da técnica em *status* epilético refratário, podendo ser considerada em pacientes com *status* refratário à medicação sem etiologia aparente das crises convulsivas. Quando há localização do foco epilético por eletrodos de superfície pobre, especialmente no córtex eloqüente, grades subdurais podem ser utilizadas para dirigir as transecções e minimizar os déficits neurológicos.<sup>16</sup>

Estudos em longo prazo pós-cirurgia da epilepsia para malformações corticais são raros. Em seu estudo, de 2007, Kral et al publicaram resultados de tratamento cirúrgico segundo a avaliação clínica anual da International League Against Epilepsy (ILAE) e a avaliação histológica de Palmimi num subgrupo de pacientes com displasia cortical focal. Foram analisados, retrospectivamente, 49 pacientes com epilepsia de longa data, nos quais a ressonância de encéfalo mostrou lesão cortical em 98% das vezes. A transecção subpial múltipla em áreas eloqüentes foi adicionada em 14 pacientes submetidos à lesionectomia ou lobectomia. Após quatro anos e meio de *follow-up*, verificou-se que 76% estavam livres das crises e que um subgrupo de 47% havia se livrado das crises desde o momento da cirurgia. O tratamento cirúrgico da epilepsia na displasia cortical focal (DCF) não só é bem-sucedido em curto prazo, mas também em

longo prazo (acima de três anos). Constatou-se, ainda, que a TSM é uma ferramenta auxiliar importante para a diminuição do número de crises na DCF.<sup>19</sup>

Boas respostas foram descritas por Chuang et al., em 2006, em pacientes com espasmos infantis atípicos intratáveis com medicação, que não mostravam lateralização à ressonância de encéfalos e foram submetidos à transecção subpial múltipla.<sup>20</sup>

Desde que o conceito de transecção subpial múltipla foi desenvolvido por Morrel e Hanbery<sup>21</sup>, esta cirurgia tem sido utilizada para o tratamento de pacientes com epilepsia droga-resistentes com foco epilético em áreas eloqüentes. Várias publicações têm tido o intuito de apresentar séries de pacientes que foram tratados com transecção subpial múltipla associada a lesionectomias (resseção das lesões epileptogênicas) ou somente lesionectomias. Uma coorte com vinte pacientes submetidos somente à transecção subpial múltipla, publicada em 2002 por Schramm et al., mostrou que, de pacientes com epilepsia e classe III de Engel,<sup>22</sup> 45% obtiveram melhora significativa com a TSM; 45% revelaram respostas pouco satisfatórias e 5% ficaram piores do que no pré-operatório. Por sua vez, os que apresentavam lesões detectáveis à ressonância magnética de encéfalo com grandes áreas de TSM tiveram resultados pouco satisfatórios<sup>23</sup>.

## **1.2. Modelo experimental de epilepsia focal: penicilina subpial**

A penicilina é estruturalmente similar ao antagonista do GABA, a bicuculina. A injeção de penicilina subpial tem potente ação epileptógena, pois ao entrar em contato com o córtex cerebral bloqueia o sistema inibidor GABA e causa epilepsia focal. O enfraquecimento da inibição mediada pelo GABA é de crítica importância para o desenvolvimento e formação da propagação das crises convulsivas iniciadas no foco epilético subpial de penicilina tornando-as generalizadas.<sup>24</sup>

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral do estudo é verificar a eficácia da Transecção Subpial Múltipla (TSM) no controle das crises epiléticas num modelo de epilepsia experimental focal.

### **2.2 Objetivos Específicos**

2.2.1: Quantificar as crises epiléticas após a TSM e compará-las com as do grupo de controle.

2.2.2: Verificar se a TSM interrompe a progressão horizontal da atividade epileptogênica no córtex cerebral.

2.2.3: Analisar a possível interferência da TSM na vascularização encefálica e a organização estrutural do córtex cerebral.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Neste estudo foram utilizados 25 ratos machos da raça Wistar, entre 60 - 150 dias de vida, com peso entre 255 a 423 gramas, procedentes do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como modelo de epilepsia focal. Os animais foram mantidos sob iluminação e temperatura controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura de aproximadamente 24 °C).

#### **3.2. Delineamento Experimental**

O estudo foi experimental, com intervenção em 25 ratos machos da raça Wistar. Após a realização de uma craniotomia hemisférica esquerda, foram implantados no córtex cerebral dos animais os eletrodos de registro eletrencefalográfico e videomonitorizados por 10 minutos para se obter o registro basal. O foco epileptogênico foi guiado por coordenadas estereotáxicas no córtex frontal correspondente à motricidade do membro anterior direito e, então, provocado com injeção subpial de penicilina G potássica cristalina a 1 mm de profundidade em todos os animais. Após esse procedimento, os animais foram observados com vídeo-EEG por 10 minutos para a quantificação e qualificação das crises. Os ratos foram divididos em dois grupos: Grupo I (Experimental), com 18 animais, nos quais foram realizadas as craniotomias seguidas de TSM; no Grupo II – Grupo Controle (Simulado ou *Sham*), com 7 ratos, foram realizadas as craniotomias sem a realização de TSM. Realizados esses procedimentos, as crises foram monitoradas novamente com vídeo-EEG por 10 minutos. Todos os

encéfalos dos animais foram submetidos a estudo anatômico e histológico para avaliação da vascularização e da organização estrutural do córtex cerebral.(Fig.1.)



Fig.1. Linha do tempo do experimento realizado

### 3.3. Indução da epilepsia

Para a indução da epilepsia os animais foram fixados num aparato estereotáxico após terem sido anestesiados com xilasina (0,1mL/g peso corporal, i.p.) e ketamina (0,1mL/g peso corporal, i.p.). Na região previamente determinada por coordenadas estereotáxicas (córtex cerebral esquerdo, correspondente à motricidade do membro anterior direito) um eletrodo foi instalado, o qual serviu de guia para a administração de penicilina G potássica cristalina subpial a cerca de 1 mm profundidade do córtex, formando um foco epilético.<sup>17</sup> A dose de penicilina foi de 500 UI subpial,<sup>24</sup> diluída em solução aquosa com seringa de microdoses de Hamilton de 10 µl, num volume de 0,4 µl. Para colocação do eletrodo e indução do foco epileptógeno foi utilizado o *Atlas de cérebro de ratos* de Paxinos & Watson (1998)<sup>18</sup>, calculando-se o ponto em 3 mm lateral à esquerda da linha média e 1 mm anterior ao bregma. A aplicação de penicilina G potássica cristalina subpial é um importante mecanismo para a elaboração e formação de descargas sincrônicas ponta-onda generalizadas, razão por que foi aplicado este modelo de indução de epilepsia.<sup>17</sup>

### 3.4. Colocação dos eletrodos



Cinco eletrodos foram colocados nos animais, depois de mantidos sob anestesia no aparato estereotáxico e submetidos à craniotomia hemisférica esquerda com um pequeno *drill* e com a dura-máter aberta. Os eletrodos foram posicionados de acordo com o *Atlas de cérebro de ratos* de Paxinos & Watson (1998).<sup>18</sup> O eletrodo situado mais anteriormente foi localizado na região cortical cerebral correspondente à motricidade do membro anterior direito; portanto, ficou a 1 mm anterior ao bregma, 3 mm lateral à linha média e meio milímetro de profundidade no córtex cerebral.<sup>14</sup> Outros dois eletrodos bipolares foram inseridos 2 mm posteriormente ao primeiro e 4 mm distanciados entre eles; outros dois foram posicionados na mesma disposição, porém 2 mm mais posteriormente.(Fig.2.)



Fig. 2. Colocação dos eletrodos e injeção de penicilina na região da motricidade do membro anterior direito do rato.

### 3.5. Técnica cirúrgica experimental da TSM

Após a indução da epilepsia, os ratos foram mantidos com seu crânio fixado no aparato estereotáxico, ainda sob anestesia, previamente realizada com xilasina e ketamina. Após o escalpo, o crânio e a dura-máter foram abertos; o córtex motor, exposto e os eletrodos foram, então, colocados. Posteriormente, duas transecções subpiaais múltiplas foram realizadas paralelas ao córtex cerebral e em sentido sagital, entre os eletrodos, de maneira tal que o eletrodo que estava situado mais anteriormente fosse isolado dos outros quatro. O objetivo era interromper a propagação das crises no sentido horizontal do córtex cerebral, deixando, assim, o eletrodo mais anterior isolado, com o foco epilético sem poder se propagar.

O procedimento em si, a transecção subpial múltipla, teve como medidas padrões para todos os animais 6 mm de comprimento no sentido ântero-posterior do encéfalo dos animais e 1 mm de profundidade no cérebro, o que foi anteriormente testado e realizado em ratos por Hashisume e Tanaka (1998). A TSM foi realizada com um bisturi lâmina 11 ou um material próprio e específico, chamado de transector, feito de arame de aço inoxidável, medindo 0,3 mm de diâmetro e com uma ponta de ângulo reto de 1 mm.<sup>14</sup>(Fig.3.)

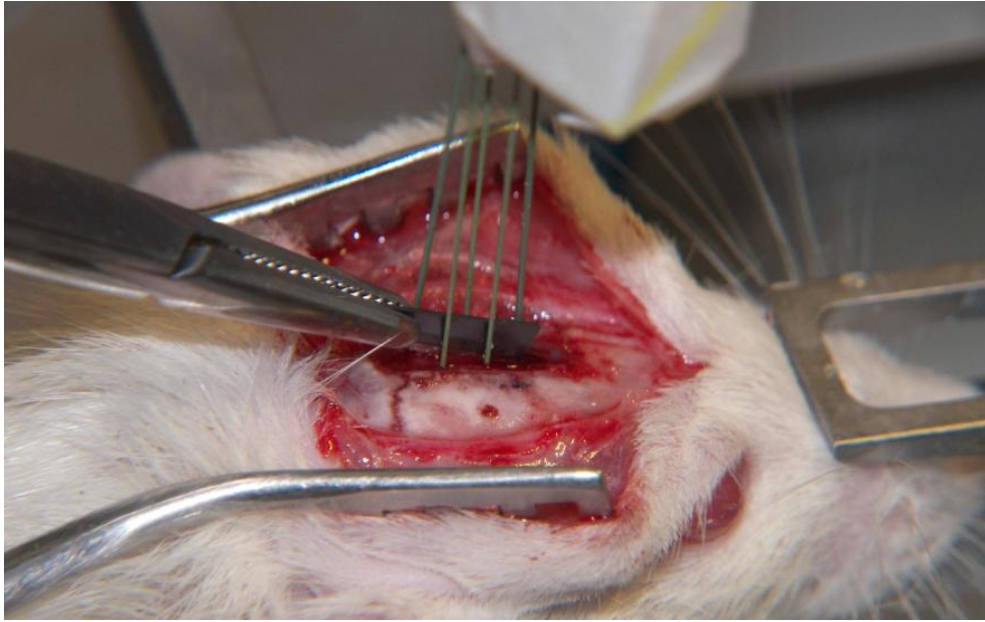


Fig. 3. Momento da transecção subpial múltipla com bisturi lâmina 11

Na Figura 4 a craniotomia hemisférica esquerda é esquematizada e representada pelo desenho do crânio de um rato na linha hachurrada. Os pontos representam o local da posição dos eletrodos no procedimento; a linha sólida, o local da craniotomia, e a linha hachurrada, as transecções subpiaais múltiplas feitas entre os eletrodos, com 6 mm de extensão e 1 mm de profundidade no encéfalo.

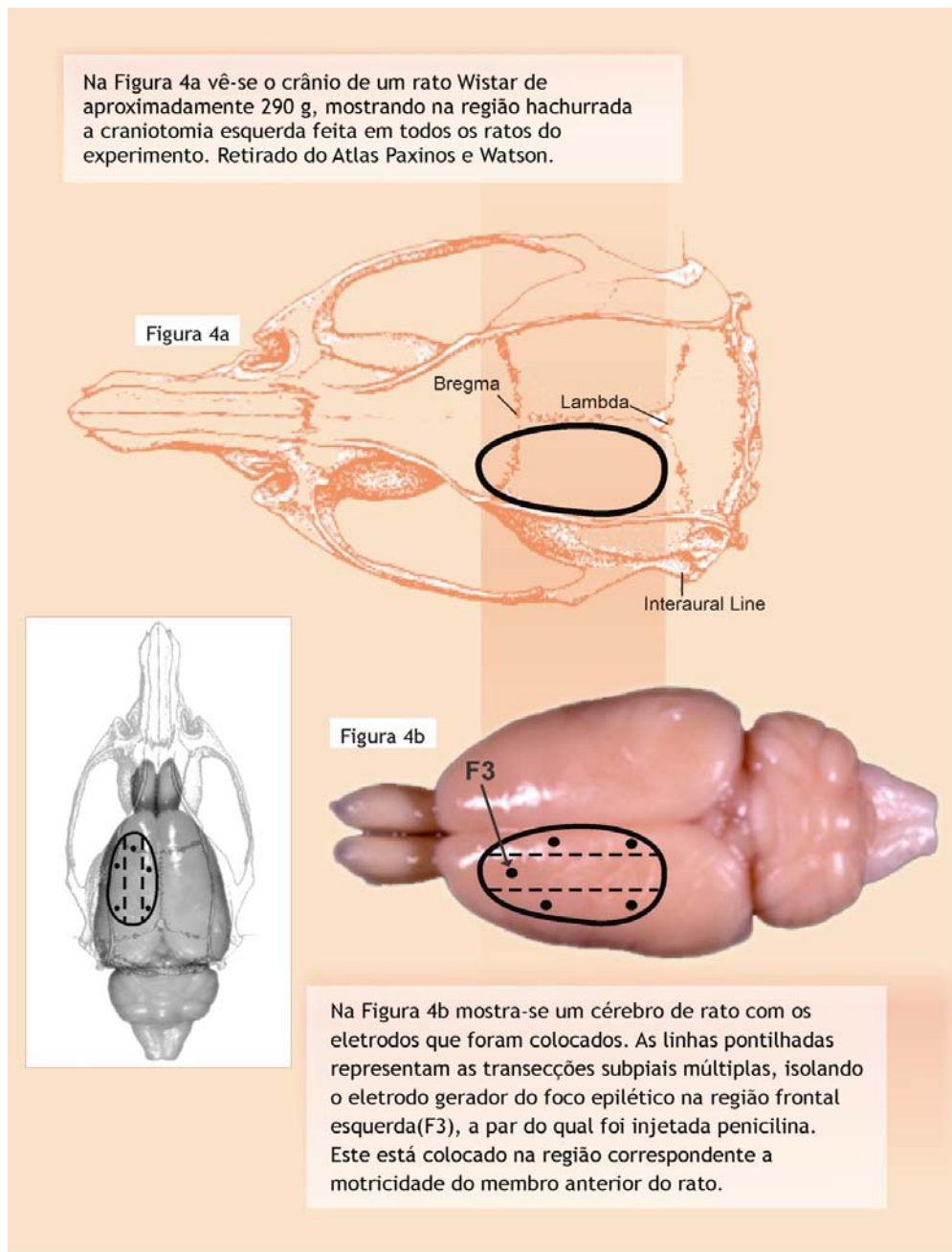


Fig. 4. O crânio de um rato e um encéfalo demonstrando os locais dos procedimentos realizados no experimento.

Fonte: [http://www.apuche.org/OIA/Anatomica1%20Images/WB01\\_Puche300x225.jpg](http://www.apuche.org/OIA/Anatomica1%20Images/WB01_Puche300x225.jpg)

[http://www.apuche.org/OIA/Anatomica1%20Images/WB01\\_Puche300](http://www.apuche.org/OIA/Anatomica1%20Images/WB01_Puche300)

### 3.6. Quantificação e monitorização das crises com vídeo-EEG

Para avaliar se a TSM diminuía a frequência das crises e/ou se interrompera sua propagação horizontal foram analisadas as manifestações comportamentais dos animais e o videoeletroencefalograma (vídeo-EEG). O registro foi realizado com o sistema de vídeo-EEG, e os dados, transmitidos ao computador, digitalizados e armazenados para análise posterior. Para registro de EEG, os eletrodos foram conectados ao amplificador de sinal diferencial Morfeu-bio (DOLSCH Ltda., RS, Brasil) com ampla banda de frequência e ganho programável. Houve determinação de rejeição de modo comum de 100 dB, e impedância de entrada maior que 100 M $\Omega$ . Em seguida, os sinais passaram por módulos condicionadores, os quais filtram com uma banda de passagem de 0,1 a 64 Hz. Foi, então, direcionado para uma placa conversora analógico-digital, sendo esta conectada a um computador, via porta serial RS232. Após este processamento, a amplificação final foi de 10.000 vezes. Os registros foram realizados utilizando-se uma taxa de amostragem de 512 amostras por segundo. Foi utilizado o *software* Morfeu-bio (DOLSCH Ltda., RS, Brasil) para receber os impulsos cerebrais transmitidos pelo conversor analógico-digital e exibi-los para a análise simultânea. Os eletrodos corticais de platina ou prata/cloreto de prata foram fixados nas projeções das áreas corticais previamente estabelecidas. Identificaram-se como crises convulsivas as manifestações visíveis e graduadas conforme a observação por vídeo e descargas paroxísticas no registro eletroencefalográfico. Os dados de EEG e a quantificação das crises no período do procedimento foram analisados por dois pesquisadores independentes, sem informações sobre o tipo de tratamento realizado. A localização do foco epileptógeno (atividade interictal) ou do início da atividade ictal foi realizada utilizando-se a montagem bipolar. A deflexão para cima foi determinada pelo pólo negativo na entrada

1 (linha cheia) e positiva na entrada 2 (linha hachurrada), a deflexão para baixo acontece em situação inversa. Utilizamos a seguinte montagem:

1. Canal 1 (CH1): entrada 1: frontal anterior (Fa); entrada 2: frontal lateral (Fl)
2. Canal 2 (CH2): entrada 1: frontal lateral (Fl); entrada 2: parietal (P)
3. Canal 3 (CH3): entrada 1: parietal (P); entrada 2: frontal medial (Fm)
4. Canal 4 (CH4) entrada 1: frontal medial (Fm); entrada 2: frontal anterior (Fa) ▾A

freqüência das descargas interictais foi verificada com contagem de pontas (*spikes*) no eletroencefalograma; de polipontas, denominadas descargas ictais recrutantes, com duração mínima de 10 segundos. A contagem foi realizada por dois especialistas em neurologia, cegos quanto ao trabalho, um com especialização em polissonografia e outro em neurofisiologia. Foi também considerado para a contagem dessas descargas ictais e interictais o local do traçado eletroencefalográfico a ser analisado; para isso foram escolhidos, em todos os traçados, os últimos 60 segundos de cada 10 minutos registrados, tanto no registro basal como no registro pós-injeção de penicilina e no registro pós-transecção subpial múltipla

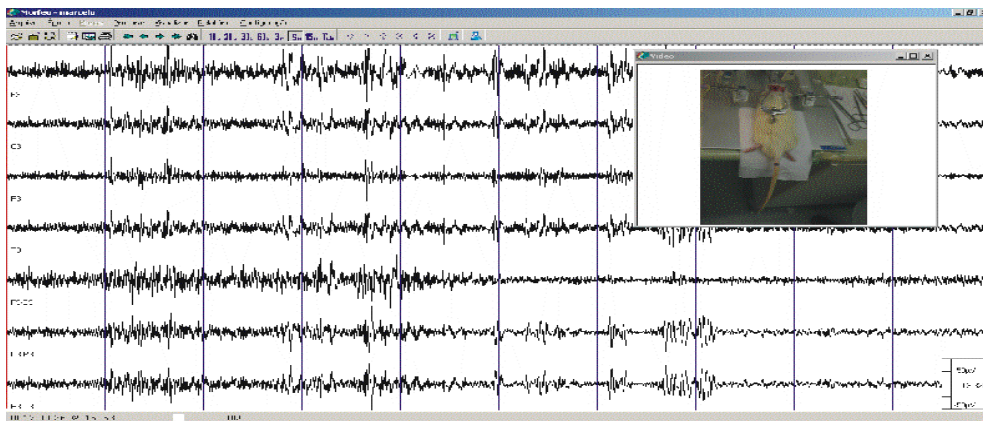


Fig. 5. Traçado eletroencefalográfico e a videomonitorização sincronizadas

### **3.7. Análise da vascularização e organização estrutural do córtex cerebral pós-transecção subpial múltipla**

A vascularização do córtex cerebral do rato e, principalmente, na região sensorio-motora é basicamente realizada pela artéria cerebral média, que cursa na face lateral do hemisfério cerebral em direção posterior e superior, ramificando-se amplamente por toda face dorsal do hemisfério cerebral. A drenagem venosa da região sensorio-motora é feita pelas veias cerebrais superiores que drenam no seio sagital superior e por ramos das veias cerebrais inferiores. A TSM foi realizada no sentido sagital, cuidando-se sempre em preservar estes ramos, tanto arteriais como venosos. A análise das estruturas vasculares pós-procedimento (TSM) foi realizada macroscopicamente, comparando-se as estruturas com a anatomia previamente conhecida.

Para a avaliação da histologia e da organização estrutural do córtex cerebral foram utilizadas a técnica histológica de Nissl e a análise microscópica das fatias de cérebro, buscando-se alterações da organização estrutural pelo procedimento cirúrgico ou pela colocação dos eletrodos. A avaliação teve também o objetivo de revelar a acurácia da TSM quanto a sua profundidade e posição perpendicular ao córtex. Os animais foram anestesiados com xilasina (0,1mL/g peso corporal, i.p.) e ketamina (0,1mL/g peso corporal, i.p.) e foram perfundidos com solução lavadora de tampão fosfatado com heparina (50 mL em de 11-dias e 100 mL em 90-dias ratas), seguido por paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.4) a 4 °C.

A velocidade da condução das soluções utilizadas na perfusão intracardíaca foi de, aproximadamente, uma gota por 5 segundos. Após a perfusão, o encéfalo foi extraído do crânio e permaneceu na mesma solução fixadora por 48 horas. Depois de

fixado, a solução de paraformaldeído foi substituída por sacarose 30% até que o material afundasse, ou seja, estivesse devidamente desidratado. Após esse procedimento, o cérebro foi congelado em nitrogênio líquido e isopentano a  $-10^{\circ}\text{C}$  e colocado imediatamente no freezer para posterior secção. Foram realizadas secções coronais seriadas do cérebro, com  $20\ \mu\text{m}$  de espessura, cortadas em um criostato e coletadas em série de fatias. Para a coloração de Nissl, as secções foram coradas com cresil violeta, e depois, desidratadas por meio de séries de álcool, clareado com xilol e encoberto com Entellan (Merk).



#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise de idade, peso, quantidade de penicilina subpial aplicada, tempo até os animais terem crises, animais que desenvolveram crises e animais que morreram, foram descritas as variáveis quantitativas com distribuição simétrica pela média  $\pm$  desvio-padrão e comparadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

Foram descritas as variáveis quantitativas com distribuição assimétrica pela mediana (mínima a máxima) e comparadas pelo teste de Mann Whitney.

Foram descritas as variáveis categóricas pela frequência absoluta e frequências relativas percentuais e comparadas pelo teste exato de Fisher.

Para a análise quantitativa das crises convulsivas a variável número de crises foi descrita pela mediana e valores mínimo e máximo dada a distribuição assimétrica do número de crises convulsivas. Foram comparadas entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney e dentro dos grupos pelo teste de Wilcoxon. Em virtude das comparações múltiplas realizadas, foi realizado um ajuste dos valores de P pela correção de Bonferroni modificada por Finner no programa PEPI. Foi considerado um nível de significância de 5%.

Os dados foram coletados e digitados no programa Excel e, posteriormente, exportados para o programa SPSS v. 15.0 para análise estatística.

## 5. RESULTADOS

Os resultados mostram que os animais tiveram peso e idade adequados tanto para o grupo cirúrgico como para o grupo de controle. A média dos ratos foi de 3,6 meses no grupo cirúrgico (intervenção) e de 3,0 meses no grupo de controle (*Sham*). Essa diferença também foi constatada, porém com muito menor intensidade, no peso dos animais, os ratos foram selecionados ou escolhidos pelo peso, não pela idade.

A quantidade de penicilina aplicada subpial foi obtida com diluição em solução salina e injetada com seringa de Hamilton acoplada para injeção de 500 UI; em apenas um animal injetou-se por duas vezes a solução, por não ter apresentado crise epilética com uma dose única de 500 UI de penicilina subpial. Esse fato resultou no uso de 1000 UI de penicilina subpial no animal para provocar-lhe crise convulsiva. Por isso, no grupo cirúrgico houve uma diferença numérica com relação ao padrão previamente estabelecido de injeção subpial de penicilina, que foi de 500 UI subpial por animal.<sup>24</sup> Todos os animais apresentaram crise convulsiva (focais, generalizadas ou ambas) com esta dose de penicilina subpial e nenhum animal teve déficit motor pós-injeção de penicilina, tanto no grupo cirúrgico agudo (os animais que foram sacrificados no dia do experimento) como no grupo cirúrgico crônico (os animais que foram sacrificados trinta dias após o procedimento).

Quanto ao tempo que os animais levaram para apresentar crise convulsiva, variou de 1 a 1080 segundos no grupo intervenção, tendo como mediana 180 segundos; no grupo *Sham*, o tempo variou de 1 a 300 segundos, tendo como mediana também 180 segundos.

A avaliação do número de animais que tiveram suas crises interrompidas, com avaliação dicotômica de ter cessado ou não a crise, mostrou que, de 18 animais do

grupo intervenção, 10 tiveram cessadas as crises com a transecção subpial múltipla, o que significa 66,7% dos casos. Quanto aos animais do grupo *Sham*, nenhum teve cessadas as crises antes da administração de Diazepam i.p. Todos esses resultados tiveram significância estatística ( $p=0,005$ ).

No grupo cirúrgico, dos 18 animais, dois morreram por provável estado de mal epilético, o que significou 11,1% do total; no grupo *Sham*, quatro animais morreram pela mesma provável causa, correspondendo a 57,1% dos ratos. Assim, verifica-se significância estatística se comparados os grupos e tem-se como “p” calculado 0,032, mostrando um maior índice de sobrevivência no grupo cirúrgico. Os resultados e números comparativos entre essas variáveis do grupo cirúrgico e do grupo *Sham*, suas médias e medianas e a relevância estatística representadas por “p” estão descritos e demonstrados na Tabela 2.

O número de animais do grupo *Sham* foi pequeno em relação ao grupo cirúrgico, pois todos os animais, até certa etapa do procedimento, sofreram exatamente as mesmas intervenções, apenas com a diferença da transecção subpial múltipla. O grupo de controle permitiu demonstrar que sem a cirurgia os animais morrem mais em decorrência do não-tratamento cirúrgico e conseqüente estado de mal epilético.

**TABELA 2**  
COMPARAÇÃO E VALOR ESTATÍSTICO ENTRE O GRUPO CIRÚRGICO  
(INTERVENÇÃO) E O GRUPO DE CONTROLE (*SHAM*).

Resultados	Intervenção (Cirúrgico) n=18	Não intervenção (Sham) n=7	p
Latência para a primeira crise convulsiva clínica (segundos)	180 (1 a 1080)	180 (1 a 300)	0,413
Números de animais cujas crises cessaram	10 (66,7%)	0 (0)	0,005
Número de animais que morreram	2 (11,1%)	4 (57,1%)	0,032

A análise da frequência das descargas elétricas foi realizada com a contagem numérica de *spikes* para descargas interictais e de polipontas recrutantes para descargas ictais nos últimos 60 segundos dos 10 minutos de vídeo-EEG do registro basal, nos últimos 60 segundos dos 10 minutos do registro de vídeo-EEG pós- injeção de penicilina subpial e nos últimos 60 segundos do registro de vídeo-EEG pós-transecção subpial múltipla. Os resultados foram compatíveis com um registro basal sem crises ou alterações que pudessem caracterizar descargas elétricas patológicas. Todos os animais tiveram esse tipo de registro nos 10 primeiros minutos; alguns animais apresentaram alteração no EEG antes do procedimento, porém nenhum teve crise convulsiva clínica ou descarga ictal durante os 10 minutos iniciais de registro basal. A montagem foi realizada a partir do foco feito com penicilina, que se localizava imediatamente ao lado do eletrodo F3. Obteve-se, desse modo, o traçado do eletroencefalograma em quatro registros, assim descritos: Fa em relação à Fl (CH 1), Fl em relação à P (CH 2), P em relação à Fm (CH 3), Fm em relação à Fa (CH 4). O canal 3 foi escolhido para a contagem das descargas ictais, pois era um canal em que não havia interferência nenhuma pós-TSM do foco epilético realizado em F3 com injeção de penicilina subpial.

Pode-se observar na Figura 6 que o CH 1 é composto por Fa, cuja linha é contínua, e Fl, cuja linha é hachurrada; o CH 2 é composto por Fl, cuja linha é contínua, e por P, cuja linha é hachurrada; o CH 3 é composto por P, cuja linha é hachurrada, e por Fm, cuja linha é contínua; e o CH4 é composto por Fm, cuja linha é contínua e por Fa, cuja linha é hachurrada.

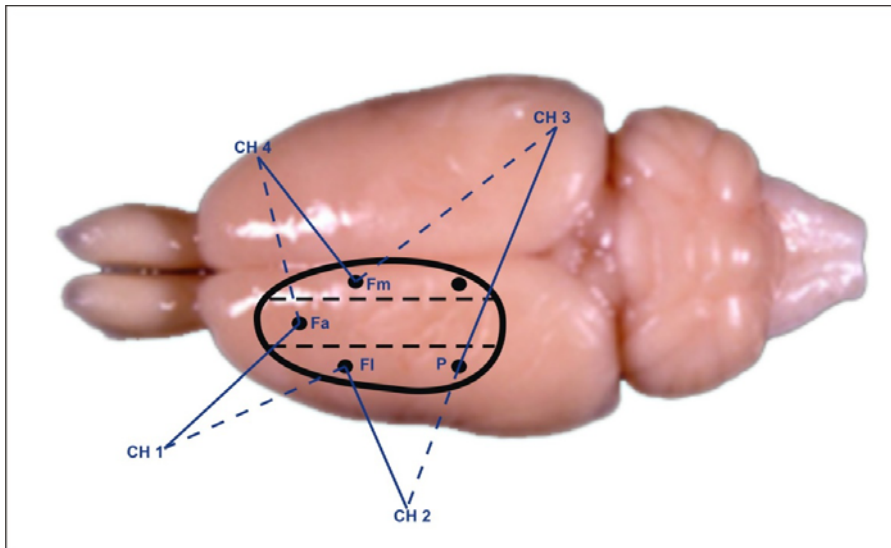


Fig. 6. Ilustração dos quatro canais registrados no eletroencefalograma (CH1, CH2, CH3 e CH4).

Na Figura 7 pode-se observar na letra “A” a imagem do eletroencefalograma em registro basal sem alterações de qualquer natureza epileptogênica, mostrando que o animal não era epilético antes da injeção de penicilina; o vídeo revelou que o animal não teve crises convulsivas comportamentais. Na imagem “B” pode-se visualizar um traçado eletroencefalográfico de 20 segundos após a injeção de penicilina subpial, com crises e *spikes* de alta frequência e amplitude, sendo acompanhadas pelo vídeo com crises focais no membro anterior do rato e crises convulsivas generalizadas acompanhando ciclicamente as alterações do eletroencefalograma. Na imagem “C” exemplifica-se um traçado de desaparecimento da atividade ictal e interictal com atenuação do ritmo de base do EEG logo após a TSM (inferindo depressão alastrante)<sup>25</sup> por 20 segundos, e a imagem “D” mostra um traçado após as duas transecções subpiaais múltiplas com retorno da atividade de base à amplitude fisiológica 5 min após a TSM e diminuição importante da amplitude e da frequência das pontas (*Spike*) e das crises

clínicas generalizadas. As crises focais permaneceram nos animais, uma vez que o foco de penicilina foi isolado para não propagar crises generalizadas.

Observou-se por alguns segundos, em todos os animais, depois do trauma da aplicação de droga e da transecção subpial múltipla, um fenômeno correspondente ao desaparecimento da atividade ictal e interictal. As amostras de registros da Figura 7 são de 30 segundos, onde se podem observar diferenças nítidas entre os traçados eletroencefalográficos do registro basal pós-aplicação, como frequência e amplitude de traçado.

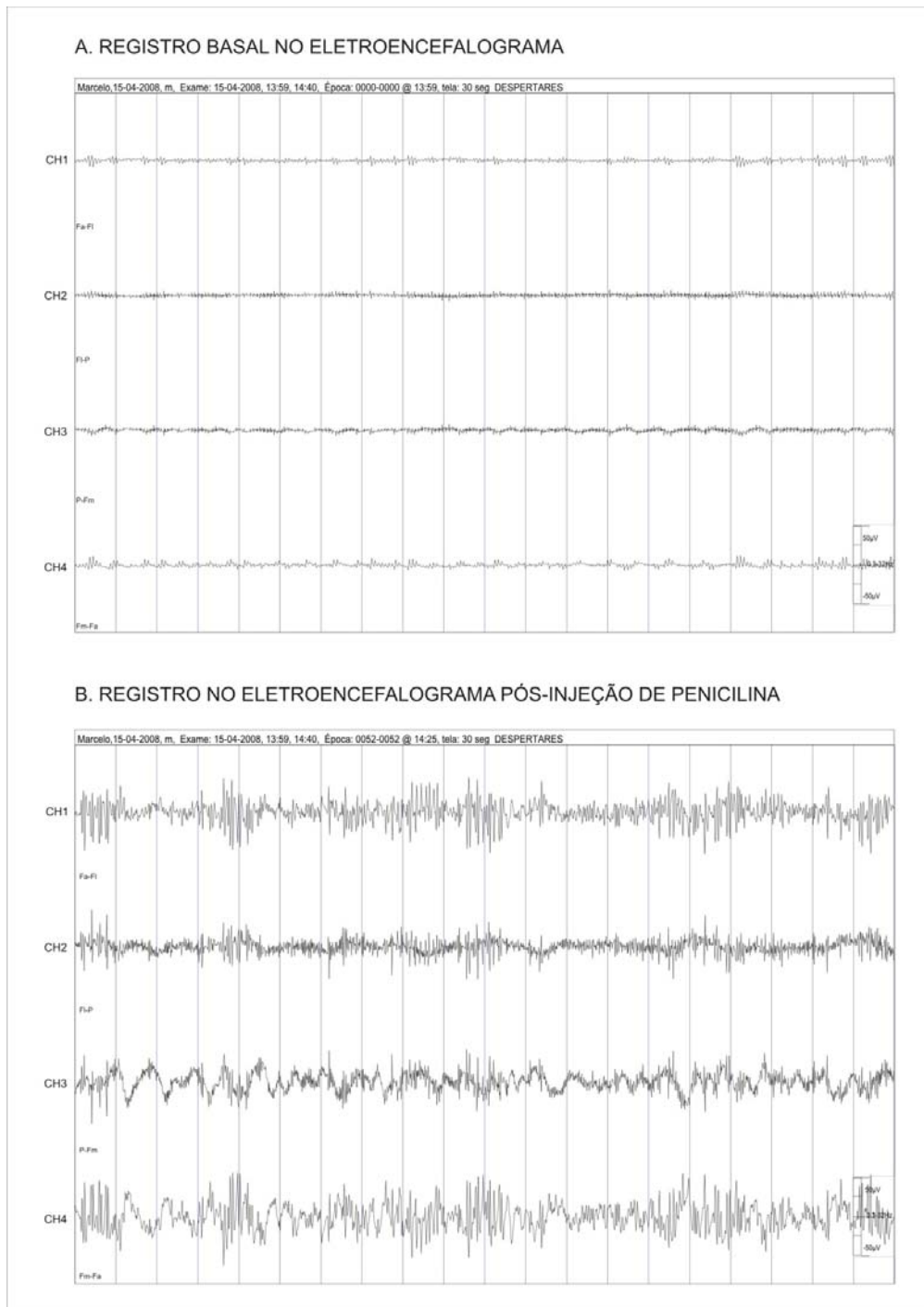


Fig. 7. A) Amostra de 30 segundos do registro basal, B) Amostra de 30 segundos pós-injeção de penicilina.

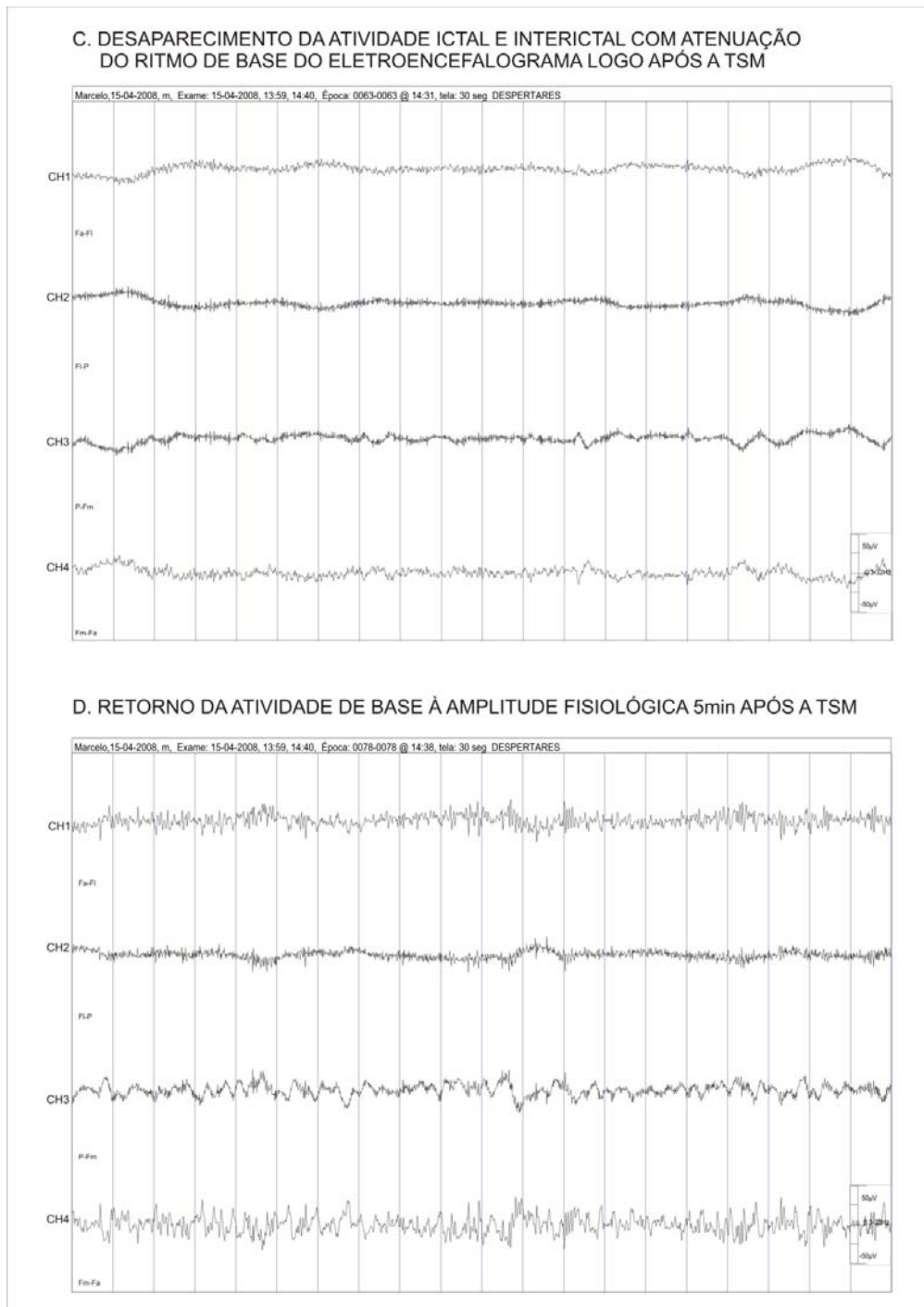


Fig. 7. C) Amostra de 30 segundos de EEG com atenuação do ritmo de base pós-TSM; D) Amostra de 30 segundos após o retorno do ritmo de base e pós-TSM.



A análise quantitativa das descargas interictais foi realizada nos últimos 60 segundos dos procedimentos, tanto no grupo cirúrgico (intervenção) como no grupo de controle (*Sham*). Assim, foram colocadas em equivalência a mediana das crises pós-tratamento cirúrgico (TSM) no canal 3(CH3), que foi 7 (1 a 16 ), e a mediana do grupo *Sham*, que foi 20 (6 a 35). Esses resultados revelam que a TSM diminuiu as crises no canal 3 (canal isolado com a TSM) em comparação às do grupo de controle, o que ocorreu também na monitorização por vídeo. Os valores de p tiveram significância estatística, pois resultaram em 0,012. (Tabela 3).

**TABELA 3**  
VALORES EM MEDIANA DAS DESCARGAS INTERICTAIS DOS ANIMAIS  
DO GRUPO CIRÚRGICO E DE CONTROLE E O VALOR DE p

GRUPO CIRÚRGICO X GRUPO DE CONTROLE			
	MEDIANA		p
	PÓS-TSM	ÚLTIMOS 60 seg DO EEG	
CH 3	7(1 a 16)	20(6 a 35)	0,012

Foram quantificadas as descargas interictais nos últimos 60 segundos do registro basal e nos últimos 60 segundos no registro pós-penicilina do grupo cirúrgico e após, devidamente comparados. Obteve-se um aumento das descargas interictais com a injeção de penicilina subpial com mediana para registro basal de 1,5 (0 a 15) e mediana para pós-penicilina de 17,5 (7 a 60), e um valor de p significativo <0,001(Tabela 4).

Quantificaram-se, também, as descargas interictais nos últimos 60 segundos do grupo cirúrgico pós-injeção de penicilina e nos últimos 60 segundos pós-TSM. Os resultados revelaram diminuição importante (com valores de mediana no canal 3 pós-

penicilina de 17,5 (7 a 60) e de 7 (1 a 16); no pós-TSM, o valor de p se mostrou <0,001) das descargas ictais com o tratamento cirúrgico (TSM) (Tabela 4).

**TABELA 4**  
DESCARGAS INTERICTAIS NO GRUPO CIRÚRGICO COM MEDIANAS E O VALOR DE p

GRUPO CIRÚRGICO (descargas interictais)			
MEDIANA			
	PÓS-PENICILINA	PÓS-TSM	p
CH 3	17,5(7 a 60)	7(1 a 16)	<0,001

Também foram comparados o número de descargas ictais nos últimos 60 segundos logo após a injeção de penicilina e o número de descargas ictais dos últimos 60 segundos ao fim do procedimento no grupo de controle. Essa comparação mostrou que as descargas ictais não tiveram diminuição sem o tratamento cirúrgico (TSM), mas um aumento do número de atividades interictais. Os valores no canal 3 em medianas foram de 14 (0 a 26) para pós penicilina e de 20 (6 a 35) para o fim do registro ou do procedimento, com valor de p de 0,091, como se pode ver na Tabela 5. Consideram-se como descargas interictais pontas (*spikes*).

**TABELA 5**  
DESCARGAS INTERICTAIS NO GRUPO DE CONTROLE E O VALOR DE p

GRUPO DE CONTROLE (descargas interictais)			
MEDIANA			
	PÓS-PENICILINA	ÚLTIMOS 60 seg DO EEG	p
CH 3	14(0 a 26)	20(6 a 35)	0,091

A frequência das descargas ictais no grupo cirúrgico foi mencionada e relatada em mediana dos registros pós-injeção subpial de penicilina (droga) e pós-cirúrgico (pós-TSM) no canal 3 do eletroencefalograma. Quando comparadas as medianas dos registros pós-penicilina e pós-TSM, verificou-se uma diminuição das atividades ictais pós-tratamento cirúrgico (pós-TSM) com relevância estatística e valor de  $p=0,003$ . Os valores de mediana (com mínima e máxima) ficaram 1 (0 a 6) na análise do registro pós-penicilina e de 0 (0 a 1) no grupo pós-TSM (Tabela 6).

Considerou-se como descargas ictais polipontas recrutantes aquelas com duração mínima de 10 segundos na análise do eletroencefalograma.

**TABELA 6**

VALORES DE MEDIANA DE DESCARGAS ICTAIS NO CANAL 3 NOS REGISTROS PÓS-APLICAÇÃO DE PENICILINA E PÓS-TSM. VÊ-SE TAMBÉM O VALOR DE P REFERENTE À COMPARAÇÃO DE VALORES PÓS-PENICILINA E PÓS-TSM

<b>GRUPO CIRÚRGICO (descargas ictais)</b>			
	<b>MEDIANA</b>		<b>p DROGA/TSM</b>
	<b>PÓS-PENICILINA</b>	<b>PÓS - TSM</b>	
<b>CH 3</b>	<b>1(0 a 6)</b>	<b>0(0 a 1)</b>	<b>0,003</b>

Foram analisadas as medianas da frequência das descargas ictais do grupo de controle (Sham) entre o registro basal (com valores de mediana de 1 (0 a 2) do canal 1, 0 (0 a 1), canal 3 e 0 (0 a 1) e canal 4) com registro realizado após a injeção de penicilina (com os valores de mediana 11 (2 a 38) no canal 1, 10 (2 a 39) no canal 3 e 7 (0 a 40) no canal 4). Observou-se, assim, um aumento significativo das crises clínicas (registradas no vídeo) e, principalmente, das descargas ictais elétricas (registradas no eletroencefalograma). Esse aumento foi comprovado pela significância estatística do p

final entre os registros basal e pós-penicilina (droga), no valor de 0,053 em todos os canais do eletroencefalograma (Tabela 7). O resultado mostrou que a penicilina aplicada em região subpial exerce um potente efeito epilético focal e generalizado, pois após alguns minutos gera a descarga epileptogênica para praticamente todo o hemisfério cerebral no qual foi injetada. No grupo de controle, em especial, obteve-se boa captação elétrica nos eletrodos, com exceção do canal 2 (CH 2), no qual o registro em alguns animais exibiu alta impedância e por esta razão não foi considerada na presente análise .

**TABELA 7**  
MEDIANA DE DESCARGAS ICTAIS DOS REGISROS BASAL E PÓS-APLICAÇÃO DE  
PENICILINA COM VALORES DE p

<b>GRUPO DE CONTROLE</b>			
	<b>MEDIANA</b>		
	<b>BASAL</b>	<b>DROGA</b>	<b>P BASAL/DROGA</b>
CH 1	1(0a2)	11(2 a 38)	0,053
CH 3	0(0 a 1)	10(2 a 39)	0,053
CH 4	0(0 a 1)	7(0 a 40)	0,053

Os resultados da análise histológica foram analisados por meio de lâminas obtidas das regiões do cérebro do rato com cortes histológicos por toda a extensão ântero-posterior das transecções subpiaais múltiplas. A Figura 8 (imagem inferior) representa um corte histológico do encéfalo de um animal, dando-se ênfase ao hemisfério cerebral esquerdo do rato. Nela se podem observar setas em preto, que mostram as transecções subpiaais múltiplas com profundidade (1 mm) e espaçamento entre elas (2 mm) adequados; verifica-se também mínima lesão da citoarquitetura do

córtex cerebral, o que deixa as fibras verticais motoras íntegras. Na Figura 8 (imagem superior) apresenta-se a figura correspondente ao Atlas de Paxinos e Watson.<sup>18</sup>



Fig. 8. Imagem histológica ampliada correspondente ao *slice* do Atlas Paxinos e Watson

## 6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Com relação à idade dos animais, observou-se uma diferença estatística entre os do grupo cirúrgico e os do grupo *Sham*, já que a média de idade dos ratos do grupo intervenção foi de 3,6 meses e, no grupo *Sham*, de 3,0 meses. Essa condição não parece ter tido impacto nos procedimentos realizados entre um grupo e outro, pois todos os animais tinham mais que 60 dias; logo, não havia diferença significativa de maturação cerebral ou de tamanho dos seus encéfalos. Portanto, a idade dos animais não representou perda para o resultado do trabalho.

Durante os procedimentos utilizou-se como regra padrão a aplicação de 500 UI de penicilina G potássica de maneira subpial na sintopia cerebral do membro anterior dos animais para gerar crises convulsivas, ou seja, para torná-los epiléticos. Todos os animais desenvolveram crises momentos após a injeção de penicilina, exceto um, no qual se utilizou o dobro da dose de penicilina para que desenvolvesse crises convulsivas. As injeções neste animal foram espaçadas por um tempo de 20 minutos; portanto, passaram-se 20 minutos de observação para que fosse injetada nova dose de droga epileptogênica. O animal que mais demorou ter crise teve-a com 18 minutos; por isso, a droga injetada novamente foi de importância para que ele desenvolvesse crise convulsiva. Esse fato provocou diferença estatística entre os grupos na quantidade de droga subpial injetada. Assim, todos os animais tiveram crise convulsiva por indução com penicilina.

Todos os animais se tornaram epiléticos com injeção de droga em região eloqüente (região cerebral correspondente ao membro anterior direito do rato), mas nenhum desenvolveu déficit motor tanto no período agudo (24 horas) como no período crônico (30 dias após o procedimento), demonstrando que a lesão da injeção de

penicilina e as transecções subpiais múltiplas não interferiram de nenhuma maneira e em nenhum animal na motricidade. Essa constatação reforça o conceito de que as fibras motoras são exclusivamente verticais, iniciando-se no córtex cerebral e avançando na direção da profundidade do encéfalo para regiões como o tálamo e o tronco cerebral.<sup>14</sup>

O tempo que os animais demoraram a apresentar crises variou de 1 a 1080 segundos no grupo cirúrgico e de 1 a 300 segundos no grupo de controle, havendo medianas equivalentes; porém, houve diferença estatística, o que remete à dedução de que, como o grupo cirúrgico tinha um “n” maior, por conseqüência, isso poderia ter causado uma diferença no tempo decorrido para os animais terem crises. Segundo Hashisume e colaboradores (1998) as crises e descargas iniciaram-se somente 30 min após injeção de ácido kaínico.<sup>14</sup> Utilizando o mesmo modelo do presente trabalho, Bağirici e colaboradores (2006) demonstraram que as atividades elétricas após a injeção cortical de 500UI de penicilina G potássica iniciaram-se em  $5,2 \pm 1,9$  minutos, o que está de acordo com os nossos achados.<sup>24</sup>

Entre o grupo cirúrgico e o grupo de controle houve uma comparação sobre a interrupção das crises ou não. Aproximadamente 67% dos animais do grupo cirúrgico tiveram suas crises interrompidas com a transecção subpial múltipla; os outros 33% necessitaram receber diazepam intraperitoneal para que cessassem as crises. No grupo de controle todos os animais receberam diazepam intraperitoneal, pois em nenhum deles as crises cessaram. A taxa de mortalidade foi consideravelmente maior no grupo *Sham*, já que os animais do grupo de controle não tiveram interrompidas suas crises por cirurgia e todos necessitaram de diazepam intraperitoneal para controle do estado de mal epilético, o que aumentou muito a morbidade e a mortalidade.<sup>26</sup>

A frequência das descargas interictais foi verificada com contagem de pontas (*spikes*) no eletroencefalograma; de polipontas, denominadas descargas ictais

recrutantes, com duração mínima de 10 segundos. A contagem foi realizada por dois especialistas em neurologia, cegos quanto ao trabalho, um com especialização em polissonografia e outro em neurofisiologia. Foi também considerado para a contagem dessas descargas ictais e interictais o local do traçado eletroencefalográfico a ser analisado; para isso foram escolhidos, em todos os traçados, os últimos 60 segundos de cada 10 minutos registrados, tanto no registro basal como no registro pós-injeção de penicilina e no registro pós-transecção subpial múltipla. Essa escolha deveu-se ao fato de que nos últimos 60 segundos de cada registro observaram-se menos artefatos de movimento e não se notava mais o importante fato do desaparecimento da atividade ictal e interictal, com atenuação do ritmo de base do eletroencefalograma logo após cada trauma sofrido pelo córtex cerebral do rato. Relata-se o fato de que na maioria dos animais pôde-se observar esse fenômeno, sugerindo que seja depressão alastrante, que consiste em diminuição importante da amplitude elétrica do córtex cerebral imediatamente após um estímulo artificial. Essa diminuição da amplitude inicia-se no local da lesão e propaga-se para as áreas vizinhas. Observou-se esse fenômeno principalmente após as lesões pelas transecções subpiaais múltiplas, provavelmente por ser, durante todo o procedimento, o maior trauma direto e mecânico ao encéfalo provocado nos ratos. Esse fenômeno foi descrito por Aristides Leão em 1955<sup>25</sup> e denominado como depressão alastrante, no qual ocorre uma queda acentuada na amplitude da atividade elétrica espontânea do córtex cerebral quando estimulado artificialmente; essa depressão se propaga a áreas vizinhas e, após certo período de tempo, há retorno ao quadro normal. O estímulo pode ser provocado por um toque, um choque elétrico ou substância química. No entanto, até hoje não se identificou o mecanismo que origina naturalmente o fenômeno, embora se saiba que trata-se de uma corrente *DC* (*Direct Current*) a qual se propaga devido a polarização progressiva do



córtex cerebral.<sup>25</sup> Diante desse quadro e considerando que não realizamos registro de corrente DC, poder-se-ia inferir que houve tal fenômeno após os traumas ocorridos durante o procedimento cirúrgico, como colocação dos eletrodos, contato com o sangue cortical, a craniotomia *per se* e a própria TSM, capazes de induzir esta onda de propagação de corrente DC.

Ao final dos procedimentos, tanto no grupo cirúrgico como no grupo de controle, foi realizada uma comparação entre números de interictais nos canais 1, 2, 3 e 4. Estes números mostraram descargas em menor quantidade ao final do procedimento cirúrgico do grupo que realizou transecção subpial múltipla do que no grupo de controle (que não realizou transecção subpial múltipla). Com esse resultado, pôde-se inferir que, experimentalmente, em ratos, a transecção subpial múltipla diminui o número total final de descargas interictais, assim como crises clínicas observadas ao vídeo-EEG, em comparação às de um grupo de controle (sem TSM). Entretanto, apesar dos resultados obtidos, os números não se mostraram estatisticamente relevantes, com valor de  $p > 0,05$ . O resultado não coletado no canal 2 do grupo de controle explica-se em razão de um defeito técnico no transmissor do eletroencefalograma, porém não causou prejuízo ao vídeo ou à observação comportamental dos animais.

A frequência das descargas ictais foi analisada em momentos distintos no grupo cirúrgico; por isso, pôde-se observar pela mediana feita no registro basal que houve aumento das crises após a injeção de penicilina subpial em todos os canais estatisticamente significativo, com  $p=0,003$ . Fazendo uma comparação entre as descargas ictais nos últimos 60 segundos pós-injeção de penicilina e nos últimos 60 segundos pós-TSM, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa para os canais 1 e 3 com  $p < 0,001$ , ao passo que os canais 2 e 4 tiveram alterações técnicas no eletroencefalograma que não permitiram a contagem correta das descargas. Isso se

deveu, possivelmente, ao fato de os eletrodos não terem tido o devido contato com a superfície cortical, ou simplesmente não terem registrado adequadamente as alterações eletroencefalográficas. Em trabalhos anteriores como de Hashisume e colaboradores (1998), houve a descrição de que pontas (*spikes*) surgiram logo após a administração de ácido kaínico e que as pontas rítmicas e as crises do lado contralateral da aplicação cortical logo foram detectadas e tornaram-se rítmicas em 5-10 minutos, porém não houve comparação do número de pontas, crises ou descargas ictais, como realizamos em nosso trabalho. Bağirici e colaboradores (2006), quantificaram as pontas (*spikes*) evidenciando aumento na sua frequência após a aplicação de penicilina G potássica intracortical e conseqüente diminuição após a aplicação de nimodipina intracortical. Estes dados são semelhantes aos nossos achados, mas os autores mencionados não realizaram registro das crises epiléticas (manifestação clínica).

Outro resultado que merece comentário relevante é que os animais apresentaram algumas descargas interictais no eletroencefalograma antes de serem induzidos para tal com a droga. Como a craniotomia causou mínimo trauma ao encéfalo em alguns ratos, mas houve algumas vezes contato de sangue com o córtex cerebral e até mesmo o contato com o soro (solução salina) usado para a lavagem da craniotomia, pode-se sugerir que seja esta a causa de os animais terem crises elétricas no registro basal, em pequena quantidade, é verdade, mas com capacidade para induzir irritação cortical e gerar algumas pontas sem, porém, ter gerado crise clínica ou descarga ictal. Isto está de acordo com os experimentos de Jyoti e colaboradores (2008), que utilizaram um modelo de epilepsia induzida por ferro (FeCl<sub>3</sub>) intracortical e com Sharma e colaboradores (2007), que utilizaram um modelo experimental de epilepsia com ferro subcortical, em áreas do hipocampo, observando-se, assim, a ação epileptógena do sangue e/ou do ferro da hemoglobina.<sup>27, 28</sup>

A avaliação das descargas interictais, ictais e crises convulsivas no grupo de controle permitiu estabelecer a evolução natural do procedimento de indução do foco epileptógeno. Assim, as descargas interictais observadas e avaliadas pós-injeção de penicilina nos animais sem tratamento cirúrgico (TSM) foram aumentando em frequência durante o registro eletroencefalográfico e os animais tiveram um maior número de crises clínicas, o que os levou ao estado de mal epilético até o controle com a utilização de diazepam i.p. para tentar evitar a morte destes animais.<sup>26</sup> Estes dados estão de acordo com os da literatura que apontam a penicilina injetada ou colocada no córtex cerebral como um potente agente indutor de crises convulsivas.<sup>17</sup>

Uma preocupação freqüente é quanto ao potencial de lesão determinado pelo procedimento da TSM. Para responder este questionamento, analisamos dois aspectos: identificação de eventual déficit motor e análise histológica do córtex transectado. Os trabalhos experimentais têm limitado ao período agudo a avaliação de eventual déficit funcional<sup>20</sup>. Neste trabalho num grupo de animais estendemos a observação clínica e histológica a um período de 30 dias pós-TSM. Observou-se que nenhum animal apresentou déficit motor na fase aguda (sacrificados no dia do procedimento) e crônica (sacrificados 30 dias após o procedimento). Embora se relate na literatura o aumento das crises pelo trauma cirúrgico da transecção subpial múltipla, isso não foi observado em nenhum animal analisado neste estudo. Portanto, de maneira experimental, neste trabalho, pode-se inferir que a transecção subpial múltipla não causou nenhum déficit motor aos animais nem provocou qualquer tipo de crise convulsiva tardia em trinta dias de observação, o que é um longo período considerando-se o ciclo de vida do rato. Nos procedimentos realizados em pacientes, Orbach e colaboradores (2001) verificaram que em 18,6% dos casos não houve melhora com a TSM ocorrendo inclusive o aumento do número de crises pós-TSM. Por outro lado Morrell e colaboradores (1989), em um

trabalho com 32 casos de pacientes com epilepsia prévia, 9 delas apresentam crises tardias e recorrentes após a transecção subpial múltipla, porém em nenhum dos casos as crises originavam-se do foco de onde a TSM foi realizada.<sup>10</sup> Provavelmente a recorrência ou não resolução das crises epiléticas num percentual de pacientes tratados com TSM decorre da atividade epileptógena localizada fora dos limites da TSM e/ou da complexidade maior da patologia epilética em seres humanos.

A análise histológica foi realizada para se verificar a profundidade do corte das transecções subpiais múltiplas e para analisar se este procedimento não causaria lesão significativa estrutural ao encéfalo e sua vascularização. Essas observações foram esclarecidas com os cortes histológicos, não tendo havido lesão cortical e vascular significativa nem comprometimento das fibras verticais dos encéfalos dos animais. Caracterizamos por lesão significativa aguda aquela que ultrapasse os limites de profundidade e extensão lateral da transecção. Sugiyama e colaboradores (1995) realizaram experimentos com o propósito de estabelecer as mudanças histológicas em cérebros de coelhos pós-TSM, os resultados sugeriram que a TSM interrompe não somente a sincronização neuronal, mas também condução excitatória interneuronal, mas não determinou lesão significativa.<sup>29</sup>

Portanto, teve-se o objetivo neste trabalho fazer simultaneamente um controle das crises clínicas, registradas por vídeo-EEG durante todo o procedimento associada a análise do eletroencefalograma, verificando as descargas ictais e interictais e quantificando-as. As descargas interictais tinham relação direta e foram observadas e quantificadas no vídeo-EEG com as crises focais do membro anterior direito dos animais. As descargas ictais foram diretamente relacionadas e quantificadas com as crises convulsivas generalizadas que eram também visualizadas no vídeo-EEG o que não foi realizado por outros pesquisadores.<sup>14</sup> Padronizaram-se, assim, as observações

eletrofisiológicas, as observações clínicas e comportamentais dos animais quantificando-as com o intuito de se obter uma visão global do procedimento com a preocupação de definir o bloqueio da propagação das descargas epileptógenas.

Assim, neste trabalho procurou-se associar as discussões eletrofisiológicas, histológicas e clínicas com o objetivo de melhor entender esta modalidade de tratamento para pacientes com epilepsia refratária, pois com frequência observamos que os trabalhos experimentais careciam de rigor metodológico e/ou de visão clínica. A transecção subpial múltipla é uma técnica cirúrgica de epilepsia que fornece respostas positivas no sentido de interromper a propagação horizontal das crises epiléticas corticais sem causar dano às projeções verticais dos neurônios motores e, ao mesmo tempo, causar mínimo dano estrutural ao córtex cerebral, conforme analisado histologicamente. Nossos achados reforçam o valor terapêutico da TSM nas epilepsias refratárias.<sup>16, 20, 21, 22, 23</sup>

## 7. CONCLUSÕES

O presente estudo permite as seguintes conclusões:

- 7.1. A transecção subpial múltipla diminuiu significativamente o número de crises convulsivas induzidas por penicilina G potássica aplicada em área motora do encéfalo de rato.
- 7.2. A transecção subpial múltipla interrompeu as descargas elétricas interictais em 66,7% dos animais.
- 7.3. Houve redução na amplitude e na frequência das descargas ictais no grupo experimental em comparação às do grupo de controle.
- 7.4. O grupo tratado com TSM apresentou significativamente menor número de mortes provavelmente por estes animais não evoluírem para estado de mal epilético.
- 7.5. Não houve evidência de comprometimento das fibras de projeção do córtex motor quando avaliados pela integridade da função motora e pela histologia.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> Commission on Epidemiology and Prognosis, International League Against Epilepsy (1993). Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. *Epilepsia* 1996; 34 (4): 592-6.
- <sup>2</sup> Li MI, Fernandes PT, Boer HM, Prilipko L, Sander JW. Demonstration project on epilepsy in Brasil WHO/ILAE/IBE Global campaign against epilepsy. *Arq. Neuropsiquiatr* 2007;65(supl 1):1-4.
- <sup>3</sup> De Melo NA, Yacubian EMT, Nunes ML. Crises epiléticas e epilepsias ao longo da vida: 100 questões práticas. LBE 2006, Segmento Farma, São Paulo.
- <sup>4</sup> LIGA BRASILEIRA DE EPILEPSIA. Disponível em: <[http://www.epilepsia.org.br/epi2002/show\\_livro1.asp?cap=42](http://www.epilepsia.org.br/epi2002/show_livro1.asp?cap=42)>. Acesso em: 22 abr 2007
- <sup>5</sup> Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 1981, 22:489-501.
- <sup>6</sup> Mulligan LP, Spencer DD, Spencer SS. Multiple Subpial Transections: The Yale Experience. *Epilepsia* 2001; 42(2):226-229.
- <sup>7</sup> Rooyen VF, Young NA, Larson SEM, Teskey GC. Hippocampal Kindling Leads to Motor Map Expansion. *Epilepsia* 2006; 47(8): 1383–1391.
- <sup>8</sup> Devinsky O, Romanelli P, Orbach D, Pacia S, Doyle W. Surgical Treatment of Multifocal Epilepsy Involving Eloquent Cortex. *Epilepsia* 2003; 44(5)718-723.
- <sup>9</sup> Benifla M, Otsubo H, Ochi A, Snead OC, Rutka JT . Multiple subpial transections in pediatric epilepsy: indications and outcomes. *Childs Nerv Syst* 2006; 22:992-998.
- <sup>10</sup> Morrell F, Whisler WW, Bleck, TP. Multiple Subpial Transection: a new approach to the surgical treatment of focal epilepsy. *J Neurosurg* 1989; 70:231-239.

- <sup>11</sup> Kaufmann WE, Krauss GL, Uematsu S, Lesser RP. Treatment of Epilepsy with Multiple Subpial Transections: An Acute Histologic Analysis in Humans Subjects. *Epilepsia* 37(4):342-352, 1996.
- <sup>12</sup> Orbach D, Romanelli P, Devinsky O, Doyle W. Late Seizure Recurrence after Multiple Subpial Transections. *Epilepsia* 2001, 42 (10): 1316–1319.
- <sup>13</sup> Wyler A, Wilkus RJ, Rostad SW, Vossler DG. Multiple Subpial Transections for Partial Seizures in Sensorimotor Cortex. *Neurosurgery* 1995, 37(6): 1122-1128.
- <sup>14</sup> Hashizume K, Tanaka T. Multiple subpial transection in kainic acid-induced focal cortical seizure. *Epilepsy Research* 1998, 32: 389–399.
- <sup>15</sup> Bernasconi A, Martinez V, Rosa-Neto P, D’Agostino D, Bernasconi N, Berkovic S, MacKay M, Harvey AS, Palmini A, da Costa JC, Paglioli E, Kim HI, Connolly M, Oliver A, Dubeau F, Anderman E, Guerrini R, Whisler W, de Toledo-Morrel L, Andermann F. Surgical Resection for Intractable Epilepsy in “Double Cortex” Syndrome Yields Inadequate Results. *Epilepsia* 2001, 42(9): 1124-1129.
- <sup>16</sup> Bristol RE, Gore P, Treiman D, Smith KA. Resolution of Status Epilepticus After Subdural Grid Recording and Multiple Subpial Transections. *Barrow Quarterly* 2006, 32(2): 8-11.
- <sup>17</sup> da Costa J C. Análise eletroclínica de ratos em diferentes fases do desenvolvimento com foco epileptógeno induzido por penicilina subpial [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1986.
- <sup>18</sup> Paxinos, G & Watson, C The rat brain in stereotaxic coordinates. Orlando, FL, Academic Press. 1998.
- <sup>19</sup> Kral T, von Lehe M, Podlogar M, Clusmann H, Süssmann P, Kurthen M, Ubrach H, Schramm J. Focal cortical dysplasia: long term seizure outcome after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007, Aug; 78(8):853-6.



- <sup>20</sup> Chuang MF, Harnod T, Wang PJ, Chen YH, Hsin YL, Effect of Multiple Subpial Transection on Patients with Uncontrolled Atypical Infantile Spasms. *Epilepsia*. 2006, 47(3):659-660.
- <sup>21</sup> Morrell F, Hanbery JW. A New surgical technique for the treatment of focal cortical epilepsy. *Electroencephalogram Clin Neurophysiol*. 1969, 26:120.
- <sup>22</sup> Engel J Jr, Van Ness P, Rasmussen TB, et al: Outcome with respect to epileptic seizures, in Engel J Jr (ed). *Surgical Treatment of the Epilepsies*, ed 2. New York: Raven Press, 1993, pp 609-621.
- <sup>23</sup> Schramm J, Aliashkevich AF, Grunwald T. Multiple subpial transections: outcome and complications in 20 patients who did not undergo resection. *J Neurosurg*. 2002 97:39-47.
- <sup>24</sup> Bağırici F, Bostancı M Ö. Anticonvulsive effects of nimodipine on penicillin-induced epileptiform activity. *Acta Neurobiol Exp*. 2006, 66: 123-128.
- <sup>25</sup> Leão A A P. Spreading Depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol*. 1944, 7(6):359-390.
- <sup>26</sup> Pitkänen A, Kharatishvili I, Narkilahti S, Lukasiuk K, Nissinen J. Administration of diazepam during status epilepticus reduces development and severity of epilepsy in rat. *Epilepsy Res*. 2005 Jan; 63(1):27-42.

<sup>27</sup> Jyoti A, Sethi P, Sharma D. Curcumin protects against electrobehavioral progression of seizures in the iron-induced experimental model of epileptogenesis. *Epilepsy Behav.* 2008 Dec 17.

<sup>28</sup> Sharma V, Babu PP, Singh A, Singh S, Singh R. Seizure. Iron-induced experimental cortical seizures: electroencephalographic mapping of seizure spread in the subcortical brain areas. *Seizure* 2007 Dec; 16(8):680-90.

<sup>29</sup> Sugiyama S, Fujii M, Ito H. The electrophysiological effects of multiple subpial transection (MST) in an experimental model of epilepsy induced by cortical stimulation. *Epilepsy Res.* 1995 May; 21(1):1-9.

**9. ANEXO**

**Artigo em submissão ao**  
***Journal of Neurosurgery***

Marcelo U. Crusius, MD  
Rua Uruguai, 1555, quinto andar  
99010112, Passo Fundo –RS, Brazil  
Fone: +55 54 99827351  
e-mail: crusiusm@hotmail.com  
march, 10th 2009

Journal of Neurosurgery,

Dear Srs.

We are sending this manuscript to you for reviewing aiming to publish it in the Journal of Neurosurgery as an experimental article.

I am a neurosurgeon, finishing my master degree and this manuscript refers to an experimental study with rats, where a multiple subpial transaction was done in 25 Wistar rats, an epileptic focus in eloquent area was done as well, and after that analyzed for its epilepsy efficacy.

I guarantee that it has not been previously published or sent to it in whole or submitted elsewhere for reviewing in this journal or in any other publication institution, so it is an original article.

I also guarantee that it was approved by the ethic and scientific committee from our institution.

Sincerely,

Marcelo U. Crusius, MD

# **Multiple Subpial Transection in experimental model of focal epilepsy**

**Authors:**

Marcelo U. Crusius, M.D.; Mariana M. Santos, Fto; Alexandre Dolganov, M.D.;  
Jaderson Costa Dacosta, M.D., Ph.D.

**Institution:**

Instituto do cérebro e Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul (IPB-PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

**Adress:**

Instituto do cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga  
6690, 2º. Andar, Porto Alegre, RS, 90.610-000, Brazil.

**e-mail:**

[jcc@pucrs.br](mailto:jcc@pucrs.br)

**Key words:**

Epilepsy surgery, multiple subpial transection, cerebral eloquent areas.

**Running Head:**

Multiple subpial transection in experimental epilepsy

# Multiple subpial transection in experimental model of focal epilepsy

Marcelo U. Crusius, M.D., Mariana M. Santos, Alexandre Dolganov, M.D., Jaderson Costa Dacosta, M.D., Ph.D.

Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS (IPB-PUCRS)

**Object.** Epilepsy is characterized by recurrent seizure episodes, caused by a brain abnormal electrical activity. The major part of epileptic crisis has a good response with medical treatment. However, 20-30% of epilepsy is refractory to medical treatment. Those patients are candidates to epilepsy surgery, which aims to resect areas where seizures start. When this resection is not possible like in eloquent area, an alternative is a surgical procedure called multiple subpial transection (MST), which interrupts the neuronal horizontal connections, getting down the intracortical propagation of ictal epileptic discharges. The goal in this study was to evaluate the efficacy of TSM in the control of crises in epilepsy focal experimental model.

**Methods.** We used 25 Wistar male rats, with 60-150 days of life, from Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, which served as a focal epilepsy model. The animals were kept under controlled illumination and temperature. After anesthetic procedure the animals were fixed in the stereotaxic apparatus and left craniotomy was done and dura-mater was taken out, then five electrodes were fixed at the cerebral cortex and video-electroencephalogram (video-EEG) was registered for 10 min. At this point penicillin G potassic crystalline was injected subpially in the same local to the most anterior electrode which was always in correspondence to the forelimb motor cortex, and then 10 min video-EEG was registered. After that procedure the groups were divided in two: experimental group in which a multiple subpial transection (MST) was performed and the Sham group in which MST was not performed, in both groups a ten-min video-EEG was registered.

**Results.** The time to get seizures had the same median in a surgical group and in the control group (180s). Ten rats had their seizures stopped (66,7%) in the surgical group and no one in the control group. Two animals (11,1%) died in a surgical group and 4(57,1%) in the control group. In the channel 3 the median of interictal discharges post-TSM was 7(1 to 16) and in the end of register of control group 20 (6 to 35),  $p=0,012$ . For the interictal discharges in a surgical group the median post-penicillin was 17,5 and post-TSM was 7 ( $p<0,001$ ), in the control group was 14 post-penicillin and in the end of the register 20 ( $p=0,091$ ). For the ictal discharges the median in the surgical group for the post-penicillin was 1(0 to 6) and 0(0 to 1) post- MST ( $p=0,003$ ). There was not motor deficit after the procedure in any animals; also there was no significant histological alteration in the rats.

**Conclusion.** These findings suggest the trial of MST stops or decreases the electrical spreading of epilepsy crisis in brain cortical layer of rats. It demonstrates that it is an effective surgical therapy for refractory epilepsy focused on cerebral eloquent areas.

## Introduction

Epilepsy is a neurologic common chronic condition, also known as a recurrent seizures, it is sometimes sub diagnosed and has prevalence approximately at fifty millions of people in the world what represents 1% of general population with most common incidence between 18 e 65 years old.<sup>7</sup> The prevalence of epilepsy in Brazil is similar to other developed countries and the lack of treatment is very big. The Epilepsy is most prevalent between poor economic social people and in older people (above 59 yo). However, the lack of treatment is similar between social classes.<sup>17</sup> This pathology is characterized when the patient presents at least two seizures without toxic-metabolic disease (i.e.: fever, hemodynamic and electrolytic alterations), it can be secondary, caused by cerebral lesions (tumors, malformations, post traumatic injuries, genetic disturbs, and vascular disease). When epilepsy does not have a known cause it is called cryptogenic and idiopathic when it is directly related with genetic transmitting.<sup>7</sup>

There are some situations that unchain seizures. These conditions are basically the hyperventilation, photo stimulation, sleepless, fatigue, constipation, menstrual period, stress and alcoholism. These seizures are broken out just in patients who have some predisposition to have it.<sup>7</sup> The kind of seizures depends on the injured area and its degree of spread. Epilepsy can be classified clinically as focal when epileptic discharge do not spread and generalized when both cerebral hemispheres are reached by epileptic discharges initiated in a focal cerebral. The people with epilepsy can present different degrees of propagation and different localization of epileptic focus, originating from different kinds of seizures getting this way the base of its classification.<sup>7</sup>

The clinical epileptic crisis manifestations depend on the discharge localizations as well as their possible spread neighbors' areas. The crisis has a big variety of presentations like lack of consciousness, movement disturbance, sensitive and sensorial alterations, vegetative and compartmental symptoms. It can be very fast or very prolonged which demands emergency treatment, if it has a long duration (more than 30 min) or it presents successive seizures we can call it status epilepticus.<sup>9</sup>

Epilepsy is divided basically in partials, generalized and no classified. The partial ones are defined for their initial manifestation coming from a specific area in the brain confined in just one cerebral hemisphere. However, they can have conscious alteration, and then it can be called complex partials; if there is no conscious alteration they are called simple partials.<sup>15</sup> The generalized seizures are those ones which have a loss of conscious since the beginning, idiopathic if they are transmitted genetically and cryptogenic if there they have a supposed organic cause with no clear etiology.<sup>18</sup> There is an epilepsy classification resume validate in 1981 for International League Against Epilepsy (ILAE) which is accepted internationally.<sup>6</sup>

Seizures present transitory symptoms and signs due to abnormal and excessive synchronic neuronal activity in the brain and they are usually controlled with medication. However, in some cases they have refractory clinical treatment, and then the surgery treatment is needed for partial or total control of it.<sup>7,21</sup>

Within all kinds of epilepsy surgery there are amigdalohipocampectomies which consist of a resection of amygdale and hippocampus in patients with mesotemporal epilepsy. Rooyen and cols, in 2006, demonstrated in an experimental study that electric discharge spread from hippocampus can cause long distance effects in a motor cortex.<sup>21</sup> There are also resections of epileptogenic focal lesions that can determinate deficits signals and break out seizures refractory to the clinical treatment.

The multiple subpial transection is a kind of epilepsy surgery, which was first described in 1969 by Frank Morrell and has the principal goal to treat surgically, with refractory epileptic patients and epileptic focus in eloquent areas with serious restrictions for lesion resection, causing this way a minimum or any neurological deficit; it can be done alone or complementary to a lesion resection. It is difficult to evaluate the MST validity because the results cannot be compared with controls, therefore in many cases MST is carried out with cortical lesion resection. The resection combined with MST is used to treat refractory seizures in eloquent cortex areas and no eloquent areas which have multiple focus, according to Devinsky and cols (2003) it seems to improve seizures control.<sup>10</sup> The difficulty in evaluation was due to a lack of knowledge if the seizures got better because of TSM or surgical resection plus MST.<sup>21</sup> The principle of MST is based in a cortical neuronal organization, in its functional model and in its electric activity during the epileptogenic activity spreading.

Previously demonstrated in cats, the cerebral cortex organization is oriented for standard columns of neuronal cells which are capable of any functions independently of synchronization activity and horizontal spread of epileptic discharges.<sup>2</sup> In such case, the functional activity unity is vertical and epileptic crisis spreads in horizontal way. Because there is a minimal continuous quantity necessary of cerebral cortex to maintain the functional activity, Morrell proposed the MST which breaks off just horizontal spreading.<sup>21</sup>

The procedure in humans consists of a delimitation of epileptogenic areas from electrocorticography. The surgical technique consists of a bipolar coagulation in distant points approximately within 5 cm of distance between them, after that the MST is performed with a transector or with a blade to connect those points previously coagulated.<sup>20</sup>

Kaufmann and cols (1996), performed neuropathology studies in eight patients, who were submitted to MST and some of them were later submitted to a temporal lobectomy for lesion resection and histopathology studies of results of MST. In most of the cases, this technique showed horizontal epileptogenic spreading disjunction with perpendicular lesion in cerebral cortex, but in a third part of cases it caused an additional lesion in a deep area which would divide afferent and efferent neurons and also lesioned the white-gray matter junction, which was analyzed as an additional factor in the control of epileptic crisis.<sup>20, 14</sup>

Considering late epileptic crises recurrence after MST, Orbach and cols (2001), proposed that the biggest problem of the MST, when performed alone, could be the



increase of frequency and later recurrence of that crisis. In this paper the authors studied and followed 54 patients who were submitted to an MST for a medium period of 56 months. They verified that 79,6% of patients decreased significantly their frequency of seizures; 50% got free from seizures; however, 18,6% after a initial decrease of seizures got worse many years after surgery.<sup>22</sup>

Wyler and cols (1995), described clinical cases of six patients with partial seizures started from sensory-motor cortex, diagnosed by video-electroencephalogram and cerebral mapping in trans-op which did an MST with a surgical technique modification (the MST was done with a sharpened epilepsy hook and deeper than the original description to get less pial vessels lesion).<sup>27</sup> Among the obtained results in this study, four patients who did not demonstrate magnetic resonance image abnormalities showed cortical gliosis in a trans-op biopsy. Just one patient did not get better in frequency of seizures and neuropsychological tests concluded that those patients did not get post-op deficits. For that, the author recommended the hypothesis that these patients represented the perirolandic or central epileptic syndrome reporting to a cortical gliosis that neuroradiological studies did not show.<sup>27</sup>

Experimental studies in animals that evaluated the MST or at least tried to elucidate its mechanism and therapeutic are limited. Hashizume and cols (1998) published results from a study which evaluated with electroencephalogram and glucose brain metabolism the effect of MST in rats with epilepsy models. In this study cortical focal epileptic seizures were induced by injection of kainic acid directly in the left sensory-motor cortex, this activity spread besides cortex to neighborhood areas and to contra lateral sensory-motor cortex. At the same study MST was done in all area of cortical epileptogenic focus, which suppressed the spreading at ipsilateral cerebral hemisphere but did not at the contra lateral hemisphere. The animals' cerebral glucose metabolism has not changed after submitted to an MST. This results indicated that MST decreases the spreading of seizures near cortical focus, but it would not stop seizures at contra lateral hemisphere, because it does not inhibit completely the vertical connection between focus and sub cortical areas. The preservation of glucose metabolism showed that cortical function at MST area was preserved.<sup>12</sup>

As well as MST the other surgical kind of surgeries can be used as a tool to improve seizures in intractable epilepsy caused by double cortex syndrome (DCS), which is characterized by a laminar neuronal heterotopy or in bands where gray matter is localized under the normal cortex brain layer. In a multicentre study, Bernasconi and cols (2001) related eight cases of patients with DCS and intractable epilepsy. In this study the authors got no satisfactory results with focal lesion resection and noticed that colostomy offered better results in patient's seizures, but just as a palliative treatment. They also concluded that it would be necessary to study a larger group of patients to confirm the efficacy of MST in surgical treatment of intractable epilepsy in patients with DCS, since both patients treated with MST did not get better and crises were consistently focal.<sup>3</sup>

The status epilepticus represents potentially a fatal disease when crises are not controlled. Bristol and cols (2006) described a case of status epilepticus refractory to a medical therapy, including the use of three antiepileptic drugs combined to a barbituric coma. The superficial electrodes localized discreetly the epileptic focus in the left cerebral hemisphere and for that a subdural electrodes strip was placed to register electric activity.<sup>4</sup>

The multiple subpial transections were carried through subsequently and the state of badly epileptic was decided. Which it illustrates the potentiality of the technique in refractory status epilepticus. It could possible to be considered in patients with refractory status to medication without apparent etiology of the convulsive crises. When the localization of the epileptic focus for electrodes of poor surface is known, especially in the eloquent cortex, subdural strips can be used direct and the neurological transections can minimize deficits.<sup>4</sup>

Studies with long follow-up after surgery of the epilepsy for cortical malformations are rare. In a study, Kral and cols published its results of surgical treatment according to annual clinical evaluation of international league against epilepsy (ILAE) and histological evaluation of Palmimi in a sub-group of patients with focal cortical dysplasia. They analyzed, retrospectively forty-nine patients with epilepsy of long date and brain magnetic resonance showing cortical injury in 98% of the times. The multiple subpial transaction in eloquent areas was added in 14 patients who had been submitted to the lesionectomy or lobectomy. After a four-year follow-up 76% had been free of the crises and a 47% sub-group had been free of the crises since the moment of the surgery. The surgical treatment of the epilepsy in the focal cortical dysplasia (DCF) is not only successful in a short-term, but also in the long follow-up (above three years), it also evidences that the TSM is an important tool auxiliary for the reduction of the number of crises in the DCF.<sup>15</sup>

Good answers had been described by Chuang and cols in patients with untreatable atypical infantile spasms with medication, that did not show lateralization to the resonance of encephalon and that had been submitted to the multiple subpial transection.<sup>4</sup> Since then the concept of multiple subpial transection was developed by Morrell and Hanbery<sup>19</sup>, this surgery has been used for the treatment of drug-resistant patients with epilepsy with epileptic focus in eloquent areas.

Some publications have been generated with the intention to present a series of patients who had been dealt with multiple subpial transection associated to lesionectomies or then only lesionectomies. A cohort with 20 patients only submitted to the published multiple subpial transection in 2002, by Schramm et al showed that patients with epilepsy with class III of Engel,<sup>11</sup> forty-five percent got significant improvement with the TSM, forty five percent poor outcome, five percent were worse. The ones that had detectable injuries to the magnetic resonance of encephalon with great areas of TSM had poor results.<sup>25</sup>

## Methods

Twenty five adult Wistar rats were used in this study. They weighed from 255 to 423gr, and between were 60 to 150 days old. Treatment of all animals was in accordance with the guidelines set by the ethic committee of animal studies of Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS (IPB-PUCRS). The animals came from IPB-PUCRS as a focal epileptic model of epilepsy they were kept under controlled illumination and temperature (dark-light cycle of 12 hours and temperature approximately 24°C). After a left hemispheric craniotomy performed, electrodes of electroencephalographic register were implanted in cerebral cortex of all animals and then video monitored for 10 minutes to get a basal register. The epileptogenic focus was guided to the cerebral cortex stereotactic coordinates an area which corresponds to the right forelimb motricity and then 500 UI of potassic G penicillin was injected subpially with 1 mm deep in all animals. When epileptic focus was done the animals were video and electroencephalographic monitored for 10 minutes to quantify and qualify seizures. The rats were basically divided in two groups: Group I (Experimental), with eighteen animals, the craniotomy was performed forwarded to MST, in Group II (Sham), with seven animals, the craniotomy was performed without performing MST. With these procedures done the seizures were again monitored with video EEG for 10 minutes. All rat brains underwent anatomic and histological study to evaluate vascularization and organization of structural cerebral cortex.

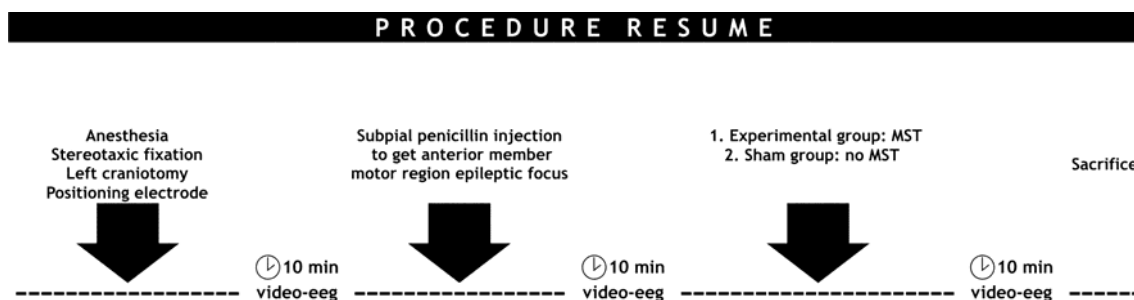


Fig .1. Diagram of the experimental protocol used in this study

## Epilepsy Induction

To epilepsy induction the animals were anesthetized with xilasin (0,1ml/g corporal weight, i.p.) and ketamin (0,1ml/g corporal weight, i.p.) and fixed in a stereotaxic apparatus. In the region previously determined by stereotaxic coordinates (cerebral cortex left correspondent to the motricity of the right forelimb) an electrode was placed, that served as a guide for potassic penicillin G crystalline subpial about 1 mm depth of the cortex, what formed an epileptic focus.<sup>8</sup> The penicillin injection was in dose of 500 UI subpially diluted in an aquose solution with microdoses Hamilton syringe of 10 µl, in a volume of 0,4 µl. The placement of electrodes and epileptic focus induction was based on the brain rat atlas of Paxinos & Watson (1998),<sup>21</sup> the point

always was calculated at three millimeters lateral to the left of midline and one millimeter anterior to bregma. The potassic penicillin G crystalline subpial application is an important mechanism for the elaboration and formation of generalized synchronous discharges tip-wave, the reason why this model of epilepsy induction was applied.<sup>8</sup>

### **Electrodes positioning**

The animals, after being kept under anesthesia in the stereotaxic apparatus and submitted to the left hemispheric craniotomy with small drill and dura-mater open, had five electrodes been placed on. These electrodes were positioned according to the de Paxinos & Watson brain rat atlas (1998),<sup>23</sup> the most anterior situated electrode was located in the cortical cerebral region corresponding to the motricity of the right forelimb, then, located one millimeter anterior to bregma, three millimeters lateral to the midline and half millimeter of depth in the cerebral cortex.<sup>12</sup> The other two bipolar electrodes were inserted two millimeters posterior to first and four millimeters of distance between them, beyond other two electrodes located in the same disposal, however, more two millimeters farther.

### **Experimental surgical technique of the MST**

After the induction of the epilepsy, the rats were kept with its skull settled in the stereotaxic apparatus, still under anesthesia previously carried through with xilasin and ketamin. After scalp, the skull and dura-mater were opened, motor cortex displayed and the electrodes placed on. Posteriorly, two multiple subpial transections were carried through parallelly to the cerebral cortex in sagittal direction, between the electrodes that were situated more anteriorly which were isolated from the others, having as objective to interrupt the propagation of the crises in the horizontal direction of the cerebrum, thus leaving the most anterior electrode isolated and the epileptic focus without power to be propagated. The procedure itself (MST) had, as measured standards, for all animals six millimeters of length (anteroposterior direction) and one millimeter of depth, what previously was tested and carried through in rats by Hashisume and Tanaka (1998). The MST was carried through with an eleven blade or proper and specific material, called transector, made of stainless steel wire measuring 0,3 mm of diameter and with a tip of straight angle measuring 1 mm or with eleven blade.<sup>12</sup>

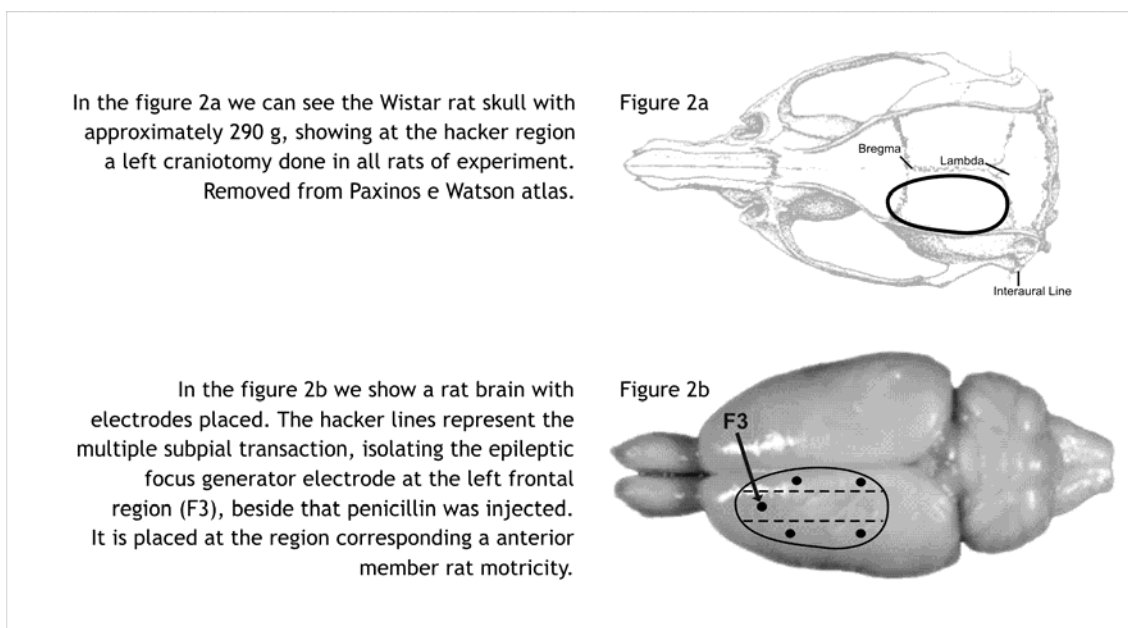


Fig.2a. shows the place of craniotomy, Fig.2b. Shows the electrodes and MST  
 From: [http://www.apuche.org/OIA/Anatomical%20Images/WB01\\_Puche300x225.jpg](http://www.apuche.org/OIA/Anatomical%20Images/WB01_Puche300x225.jpg)  
[http://www.apuche.org/OIA/Anatomical%20Images/WB01\\_Puche300](http://www.apuche.org/OIA/Anatomical%20Images/WB01_Puche300)

## Quantification and seizures monitoring with video-EEG

To evaluate if the TSM reduced the frequency of the crises and/or interrupted its horizontal propagation animal manifestations were analyzed through video electroencephalogram (video-EEG). The register was carried through with the video-EEG system; the data were transmitted to the computer, digitalized and stored for posterior analysis. The cortical platinum electrodes or silver chloride was fixed in the projections of the cortical areas previously established. Seizures with visible manifestations were registered in video-EEG and the paroxysm and discharges in the electroencephalographic register were identified. The data of EEG and the quantification of the seizures in the period of the procedure were analyzed by two independent researchers, without information on the type of through treatment carried out. The localization of the epileptic focus (interictal activity) or from the beginning of the ictal activity was realized using the bipolar installation. The up deflexion was determined as a negative pole at entrance 1 (full line) and positive in entrance 2 (hacker line), the down deflexion happens in the reverse way. To EEG register the following installation was used:

1. Channel 1 (CH1): entrance 1: frontal anterior (Fa); entrance 2: frontal lateral (Fl)
2. Channel 2 (CH2): entrance 1: frontal lateral (Fl); entrance 2: parietal (P)
3. Channel 3 (CH3): entrance 1: parietal (P); entrance 2: frontal medial (Fm)
4. Channel 4 (CH4): entrance 1: frontal medial (Fm); entrance 2: frontal anterior (Fa)

The interictal discharges were verified counting spikes in electroencephalogram, ictal discharges as recruiting polyspikes with 10 seconds of minimum duration. Two

blind neurologists analyzed those EEG at the last 60 seconds of each register (basal, post-penicillin and post- MST).

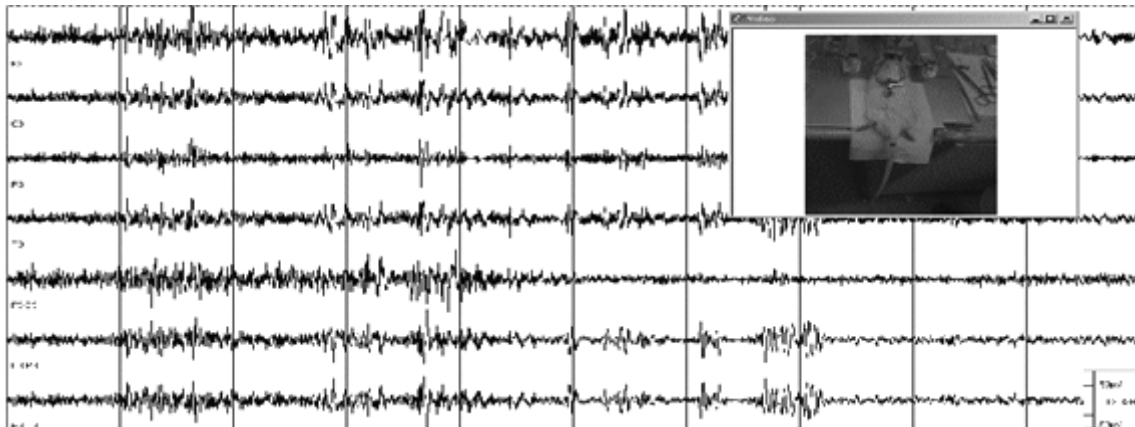


Fig.3. Video-EEG at the same time

### **Analysis of the vascularization and structural organization of the cerebral cortex after multiple subpial transections**

The vascularization of the cerebral cortex of the rat and, mainly, in the sensory-motor region, basically is carried through by the average cerebral artery, that attends a course in the lateral face of the cerebral hemisphere in posterior and superior direction, branching off widely for all dorsal face of the cerebral hemisphere. The venous drainage of the sensory-motor region is done by the superior cerebral veins which drain in the superior sagittal sinus and by branches of the inferior cerebral veins. The TSM was carried through in the sagittal direction, searching always the preservation of these branches, arterial as in such a way venous. The analysis of the vascular structures after the procedure (MST) was carried through macroscopically, comparing the structures with the anatomy previously known.

For the evaluation of the histological and structural organization of the cerebral cortex, the histological technique of Nissl and the microscopically analysis of the brain slices had been used, searching alterations of the structural organization by the surgical procedure or the rank of the electrodes. The evaluation was also given searching to disclose the accuracy of the TSM as for its depth and perpendicular position to the cortex. The animals were anesthetized with xilasin (0,1ml/g corporal weight, i. m.) and ketamin (0,1ml/g corporal weight, i.p.) and were prefunded with washer solution of drain plug phosphataded with heparin (50 ml in of 11-days and 100 ml in 90-days rats), followed by paraformaldeid 4% in drain plug phosphate 0,1M (pH 7,4) in 4o C.

The speed of the conduction of the used solutions in the intracardiac perfusion was of approximately a drop per 5 seconds. After the perfusion, encephalon was extracted of the skull and remained in the same fixing solution for 72 h. After fixed, the brain was washed by 1 h in current water and dehydrated in different concentrations of alcohol (70%, 80%, 90%, 95% and absolute alcohol) and enclosed xylol and in the final position with a resin paraplastic (Histosec - Merck). Seriates coronal sections of the brain were carried through, with 30 micrometers thickness each cut with one vibrotom and collected in a series of slices. For the coloration of Nissl, the sections were corades with

violet cresil and later dehydrated by means of alcohol series, cleared with xylol and hidden with Entellan (Merk).

## Results

The rats got clinical seizures after penicillin application and for that they had 180 seconds latency (median of 1 to 1080) in the surgical group and in the control group 180 sec (median of 1 to 300). The animal evaluation, which had their interictal discharges stopped, showed that 10 animals from surgical group had interictal discharges stopped with MST (66,7%) and no one had interictal discharges stopped in the control group ( $p=0,005$ ). Two animals died in the surgical group (11%) and 4 in the control group (57,1%) ( $p=0,032$ ).

**Table 1**

Statistic relation between surgical group and control group

Results	Intervention (surgical) n=18	Non intervention (Sham) n=7	p
Latency for first clinical seizures (seconds)	180 (1 a 1080)	180 (1 a 300)	0,413
Number of animals whose seizures had ceased	10 (66,7%)	0 (0)	0,005
Number of animals who died	2 (11,1%)	4 (57,1%)	0,032

The frequency analysis of electric discharges in EEG was realized with a numeric count of spikes (intrinsic discharges) and multispikes recruits for more than 10 seconds (ictal discharges). Which counted in the last 60 seconds of 10 min of basal video-EEG register, in the last 60 seconds of 10 min of post-penicillin injection video-EEG register and in the last 60 seconds of 10 minutes of video-EEG register post-MST. All animals got this kind of video-EEG register; some of them had alteration in EEG at basal register, but no one with ictal discharges even in clinical crisis. The electrodes installation was done starting from Fa, which was a penicillin focus to immediately beside it. This way we got a drawing of EEG in 4 channels (CH) described like that: Fa in relation to Fl (CH1), Fl in relation to P (CH2), P in relation to Fm (CH3) and Fm in relation to Fa (CH4). In the Figure 4 those channels can be identified.

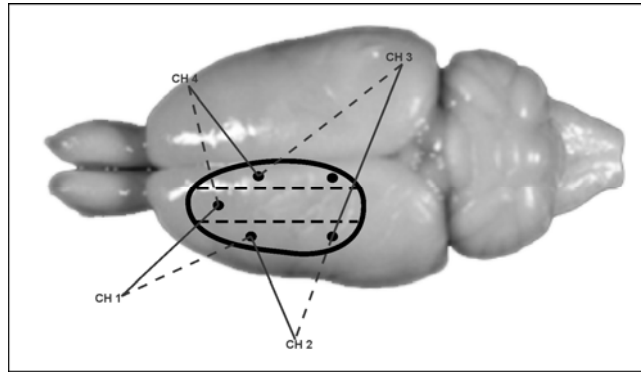


Fig.4. Illustration of four channels registered at EEG (CH1, CH2, CH3, CH4)

In Figure 5a we can see in the letter “A” a 30-second sample of EEG basal register, proving that the animals were not epileptic after the procedure. In letter “B” we can visualize a 30-second sample of register exemplifying interictal discharges after penicillin subpial application.

In Figure 5b in letter “C” we visualize a 30-second sample of disappearance of ictal and interictal activity with EEG base rhythm attenuation immediately after MST realization. In letter “D” a 30-second sample of the register after two MST shows a return of base activity to physiologic amplitude five minutes after MST.

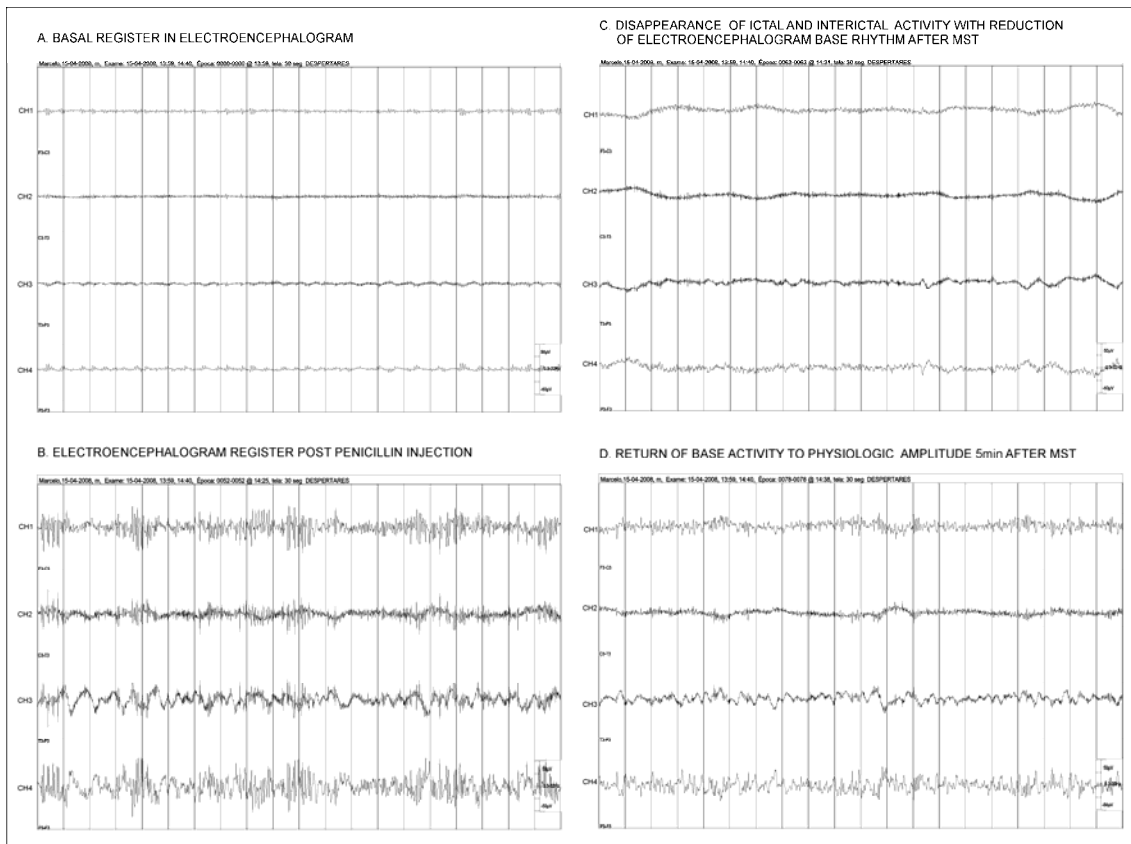


Fig.5. A) 30-second sample of EEG basal register, B) 30-second sample of EEG post penicillin injection. C) 30-second sample of register with interictal discharges after penicillin subpial application, D) 30-second sample of the register after MST with a return of base activity to a physiologic amplitude five minutes after MST.



The quantitative analysis of interictal discharges was done in 60 seconds of procedures, in the surgical group and in the control group. The medians from that was 7 (1 to 16) post MST in the surgical group and in the last 60 seconds of control group it was 20 (6 to 35) in the channel 3 ( $p=0,012$ ).

**TABLE 2**

Median values of interictal discharges of surgical and control group rats and p value

SURGICAL GROUP X CONTROL GROUP			
	MEDIAN		p
	POST MST	LAST 60 sec OF EEG	
CH 3	7(1 a 16)	20(6 a 35)	0,012

The interictal discharges were quantified in the last 60 seconds of basal register and in the last 60 seconds in the post penicillin register in the surgical group and after that they were compared. There was an increase of interictal crisis with penicillin subpial injection with median for basal register 1,5 (0 a 15) and median for post penicillin 17,5 (7 a 60), and a p value  $<0,001$ .

We quantified the interictal discharges, in the last 60 seconds of the surgical group post penicillin injection and in the last 60 seconds post. The results disclosed in an important decrease of interictal discharges (median values in the channel 3 post penicillin injection of 17,5 (7 a 60) and in post MST 7 (1 a 16) with p value  $<0,001$ ( Table 4).

**TABELA 3**

Interictal discharges in the surgical group with medians and p value

SURGICAL GROUP (interictal discharges)			
	MEDIAN		p
	POST PENICILIN	POST MST	
CH 3	17,5(7 a 60)	7(1 a 16)	$<0,001$

There was a comparison with a number of interictal discharges in the last 60 seconds after penicillin injection and the number of interictal discharges in the last 60 seconds of the EEG register in the control group. This comparison showed that

interictal discharges got an increase of interictal discharges without surgical treatment (MST). The median values in the channel 3 were 14 (0 to 26) for post penicillin and 20 (6 to 35) for the last 60 seconds of register ( $p=0,091$ ), as we can see at table 5.

**Table 4**

Interictal discharges in a control group and p value

CONTROL GROUP (interictal discharges)			
MEDIAN			
	POST PENICILLIN	LAST 60 sec OF EEG	p
CH 3	14(0 a 26)	20(6 a 35)	0,091

Ictal discharges frequency was related in median in the post penicillin injection register and post MST at the channel 3 of EEG. There was a decrease of ictal discharges post surgical treatment (MST) with p value 0,003. The medians were 1 (0 to 6) in a post penicillin analysis and 0 (0 to 1) in the post MST group. It was considering an ictal discharges as recruiting spikes with at least 10 seconds of duration.

**TABLE 5**

Median ictal discharges values in the channel 3 at post penicillin application and post MST and p value

SURGUCAL GROUP (ictal discharges)			
MEDIAN			
	POST PENICILLIN	POST MST	p DRUG/MST
CH 3	1(0 a 6)	0(0 a 1)	0,003

In the last stage we compared ictal discharges in the control group between basal register with median values 1 (0 to 2) in the channel 1, 0 (1 to 1) in the channel 3 and 0 (0 to 1) in the channel 4 with register done after penicillin injection with median values 11 (2 to 38) in the channel 1, 10 (2 to 39) in the channel 3 and 7 (0 to 40) in the channel 4. This way we observed an increase in a clinical crises (video) and in an ictal discharges (EEG) with p value 0,053.

**TABLE 6**

Ictal discharges median of basal and post penicillin injection registers and p value

CONTROL GROUP			
	MEDIAN		P BASAL/DRUG
	BASAL	DRUG	
CH 1	1(0a2)	11(2 a 38)	0,053
CH 3	0(0 a 1)	10(2 a 39)	0,053
CH 4	0(0 a 1)	7(0 a 40)	0,053

The histological analysis was done by the slices obtained from the rat brains from all its extension. In figure 8 it can be observed those black arrows showing multiple subpial transections with appropriate spacing and depth.



Fig. 6. Histological slice corresponding to a Paxinos and Watson atlas

## Discussion

With regard to the age of the animals, a difference was observed statistically between the surgical group and the Sham group, since the average of age of the rats of the group intervention was of 3,6 months and, in the Sham group, of 3,0 months. This condition does not seem to have had impact in the procedures carried through between a group and the other one; therefore all the animals were more than 60 days; soon, it did not have significant difference of cerebral maturation or size of its encephalon. Therefore, the age of the animals did not represent a loss for the result of the manuscript.

During the procedures the application of 500 UI of potassic penicillin G in subpial way in the left cerebral cortex was used as a standard rule in a sintopy of right forelimb animal to generate seizures, to make them epileptics. All the animals developed discharges or seizures moments after the penicillin injection, except one, in which was used the double of the dose of penicillin so that it developed discharges or seizures. The two injections in this animal were spaced by a time of 20 minutes. The animal that had most delayed discharges was with 18 minutes; therefore, the injected drug was again of importance so that it developed interictal discharges. This fact provoked difference statistically between the groups considering the amount of injected subpial drug. Thus, all the animals had seizures when penicillin was introduced.

All the animals developed epilepsy with injection of drug in eloquent region (corresponding cerebral region to the right forelimb of the rat), but no one in such a way developed motor deficit in the acute period (24 hours) as in the chronic period (30 days after the procedure), demonstrating that the multiple injury of the penicillin injection and subpial transections had not intervened in any way and with any animal in the motricity. This verification strengthens the theory of that the motor fibers are exclusively vertical, initiating themselves in the cerebral cortex and advancing in the direction of the depth of encephalon for two regions as the thalamus and the cerebral trunk. The time that the animals delayed to present crises varied from 1 the 1080 seconds in the surgical group and from 1 the 300 seconds in the group of control, having medium equivalents; however, it had statistical difference, what it draws to the conclusion that, as the surgical group had a bigger "n", as a consequence this could have caused a difference latency in which the animals had crises. According to Hashisume and cols (1998) the seizures and discharges began 30 minutes after kainic acid injection.<sup>17</sup> Using the same model of the present manuscript, Bağirici and cols (2006) demonstrated that electric activities post-penicillin injection started in  $5.2 \pm 1.9$  minutes. This is in accordance with our findings.<sup>1</sup>

Between the surgical group and the control group there was a comparison considering the interruption of the crises or not. Approximately 67% of the animals of the surgical group had their seizures interrupted with the multiple subpial transection; the others 33% had to receive diazepam intraperitoneal to stop the seizures. In the control group all the animals received diazepam intraperitoneal, therefore, in none of them the seizures ceased. This fact allows to infer that, experimentally, the multiple subpial transection in rats, in this paper, significantly reduced ( $p=0,005$ ) the number of convulsive crises in animals with induced epilepsy for potassic penicillin G in eloquent areas of encephalon. The mortality tax was considerably bigger in the Sham group, since the animals of the control group had not interrupted their seizures as a result of the

surgery and all needed diazepam intraperitoneal to control the state of badly epileptic, what increased very much the morbidity and, consequently, mortality.

The frequency of the interictal discharges was verified by the counting of spikes in the electroencephalogram; of multispikes, called recruit ictais discharges, with minimum duration of 10 seconds. The counting was carried through by two specialists in neurology, blind people, one with specialization in polissonography and another one in neurophysiology. Also the place of the electroencephalographic tracing was considered for the counting of these ictais and interictais discharges to be analyzed; that is why they had been chosen, in all the tracings, in the last 60 seconds of each 10 minutes registered, in the basal register as in the register penicillin after-injection and the register after transection multiple subpial. This choice was done in the last 60 seconds of each register because fewer movements were observed and it was not register the important fact of the disappearance of the ictal and interictal activity, with attenuation of the base rhythm of the electroencephalogram soon after each trauma suffered by the cerebral cortex of the rat. The fact is that in the majority of the animals this phenomenon could be observed, suggesting that it is spreading depression, which immediately consists of important reduction of the electric amplitude of the cerebral cortex after an artificial stimulation. This reduction of the amplitude is initiated in the place of the injury and spreads to the neighboring areas. This phenomenon was observed mainly after the injuries of the multiple subpial transections, probably for being, during all the procedure, the biggest direct and mechanical trauma to encephalon provoked in the rats. This phenomenon was described by Leão in 1955, which is called spread depression, and consists of a decrease of cerebral cortex electric activity amplitude when stimulated artificially, spreading to the neighborhood areas of brain.<sup>15</sup> The spread depression is observed by direct current, and since we did not use direct current to analyze the electric current, this phenomenon was not analyzed.

At the end of the procedures, in the surgical group as well as in the control group, a comparison was carried through between numbers of interictal discharges in canals 1, 2, 3 and 4. These numbers showed discharges in lesser amounts to the end of the surgical procedure of the group that carried through multiple subpial transection and in the control group (which did not carry through multiple subpial transection). With this result, it could be inferred that, experimentally, in rats, the multiple subpial transection reduces the final total number of interictal discharges, as well as the observed clinical crises to the video-EEG, in comparison to the ones of a control group without TSM. However, despite the results obtained, the numbers did not reveal to be statistically excellent, with value of  $p > 0,05$ . The result collected in canal 2 of the control group had high impedance in the transmitter of the electroencephalogram and then we did not consider this; however, it did not cause damage to the video or the observation of the animals.

The frequency of the ictal discharges was analyzed at distinct moments in the surgical group; therefore, it could be observed of median in the basal register there was an increase of the seizures after the subpial penicillin injection in all the canals statistically significant, with  $p=0,003$ . Making a comparison, according to penicillin after-injection, between the ictal discharges in the last 60 seconds and in last the 60 seconds after-MST, that a statistical significant reduction for canals 1 and 3 with  $p 0.001$  was verified. There was very high impedance in the channel 2 and 4, because of that we were not allowed to do the correct counting of discharges in those channels. In previous papers by Hashisume and cols (1998), there were descriptions in witch spikes

appear after kainic acid injection and the rhythmic spikes 5-10 minutes after, but did not have any comparison in number of spikes, seizures or discharges, as we have done in our procedures. Bağırıcı and cols (2006) quantified spikes showing an increase of its frequency post-penicillin intracortical application and decrease of spikes after nimodipin application. These data are similar to our findings, and the mentioned authors did not take down any seizures registers (clinical analysis).<sup>1</sup>

Another result that deserves to be commented is that the animals presented some interictal discharges in the electroencephalogram before being induced with the drug. As the craniotomy caused minimum trauma to encephalon in some rats, but it had sometimes contact with blood of the cerebral cortex and the contact with the saline solution that was used to wash out the craniotomy, it can be suggested that this is the cause of electric interictal discharges in the basal register, small amount, truly, but with capacity to induce cortical irritation and to generate some electric peaks as spikes, without, however, having generated clinical crises or ictal discharges. This is, according to the Jyoti and cols (2008), which utilized an epilepsy model induced by iron (FeCl<sub>3</sub>) injected intracortically and with Sharma and cols (2007) which utilized iron in hippocampus making the rats epileptics.<sup>13,26</sup>

The evaluation of interictal and ictal discharges and seizures in the control group allowed to establish the natural evolution of procedure of epileptic focus induction. So, the interictal discharges were observed and evaluated after-injection of penicillin in the animals without treatment (MST) which was increasing during the electroencephalographic register and the animals had an addition of clinical crises, what took them to the status epilepticus until being controlled with the use of diazepam i.p. to try to avoid their death.

A common preoccupation is about a potential lesion caused by the procedure (MST). To answer this question we analyzed two aspects: identification of eventual motor deficit and histological analysis of transected cortex. The experimental papers have been limited to the acute period of eventual functional deficit. In this paper, in a group of animals we observed clinically and did histological analysis for a period of 30 days. Beyond that it was observed that no animal presented motor deficit. Amongst these effects the increase of the crises for the surgical trauma of the multiple subpial transections is mentioned, what was not observed in any animal analyzed in this study. Therefore, in experimental way, in this work, it can be inferred that the multiple subpial transections did not cause any motor deficit to the animals nor provoked any type of delayed convulsive crisis in thirty days of comment. Probably the seizures recurrence or not resolution of epileptic crises in a percentual patients treated with MST comes from epileptic activity localized out of the MST limits and/or the high complexity of epileptic pathology in humans.

The histological analysis was carried out to verify the depth of the cut of the multiple subpial transections because this procedure would not cause structural serious injury to the brain and its vascularization. These comments were clarified with the histological slices, as it shows Figure 8, not having had serious cortical and vascular injury or compromising of horizontal staple fibers of the brains of the animals.

Therefore our paper wished to associate the eletrofisiologic, clinical and histological observations aiming at a better understand of this variety of treatment in patients with refractory epilepsy, because many experimental papers needed methodological rigidity and clinical vision. The multiple subpial transection is a

surgical epilepsy technique which presents good outcome in the way to interrupt the horizontal propagation of cortical seizures without causing any damage to vertical projections in motor neurons, and also causing minimal structural damage to the brain cortex of rats as we demonstrated in the histological way.

### **Conclusion**

The results of the present study show that, in animals, the multiple subpial transection reduces, significantly, the number of seizures induced by potassic G penicillin injected in motor areas of rat encephalon's. The MST interrupted the interictal electric discharges in 66,7% of animals. There was an important decrease in amplitude and in a frequency of ictal discharges, in an experimental group comparing to the control group. The group treated with MST showed significantly lower number of deaths probably for those animals did not suffer status epilepticus. There was no evidence of motor cortex projection fiber compromising when evaluated with integrity of motor function by histology

## References

- <sup>1</sup> Bağirici F, Bostanci M Ö. Anticonvulsive effects of nimodipine on penicillin-induced epileptiform activity. *Acta Neurobiol Exp.* 2006, 66: 123-128.
- <sup>2</sup> Benifla M, Otsubo H, Ochi A, Snead OC, Rutka JT . Multiple subpial transections in pediatric epilepsy: indications and outcomes. *Childs Nerv Syst* 2006; 22:992-998.
- <sup>3</sup> Bernasconi A, Martinez V, Rosa-Neto P, D'Agostino D, Bernasconi N, Berkovic S, MacKay M, Harvey AS, Palmini A, da Costa JC, Paglioli E, Kim HI, Connolly M, Oliver A, Dubeau F, Anderman E, Guerrini R, Whisler W, de Toledo-Morrel L, Andermann F. Surgical Resection for Intractable Epilepsy in “Double Cortex” Syndrome Yields Inadequate Results. *Epilepsia* 2001, 42(9): 1124-1129.
- <sup>4</sup> Bristol RE, Gore P, Treiman D, Smith KA. Resolution of Status Epilepticus After Subdural Grid Recording and Multiple Subpial Transections. *Barrow Quarterly* 2006, 32(2): 8-11.
- <sup>5</sup> Chuang MF, Harnod T, Wang PJ, Chen YH, Hsin YL, Effect of Multiple Subpial Transection on Patients with Uncontrolled Atypical Infantile Spasms. *Epilepsia.* 2006, 47(3):659-660.
- <sup>6</sup> Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 1981, 22:489-501.
- <sup>7</sup> Commission on Epidemiology and Prognosis, International League Against Epilepsy (1993). Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. *Epilepsia* 1996; 34 (4): 592-6.
- <sup>8</sup> da Costa J C. Análise eletroclínica de ratos em diferentes fases do desenvolvimento com foco epileptógeno induzido por penicilina subpial [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1986.



<sup>9</sup> De Melo NA, Yacubian EMT, Nunes ML. Crises epiléticas e epilepsias ao longo da vida: 100 questões práticas. LBE 2006, Segmento Farma, São Paulo.

<sup>10</sup> Devinsky O, Romanelli P, Orbach D, Pacia S, Doyle W. Surgical Treatment of Multifocal Epilepsy Involving Eloquent Cortex. *Epilepsia* 2003; 44(5):718-723.

<sup>11</sup> Engel J Jr, Van Ness P, Rasmussen TB, et al: Outcome with respect to epileptic seizures, in Engel J Jr (ed). *Surgical Treatment of the Epilepsies*, ed 2. New York: Raven Press, 1993, pp 609-621.

<sup>12</sup> Hashizume K, Tanaka T. Multiple subpial transection in kainic acid-induced focal cortical seizure. *Epilepsy Research* 1998, 32: 389–399.

<sup>13</sup> Jyoti A, Sethi P, Sharma D. Curcumin protects against electrobehavioral progression of seizures in the iron-induced experimental model of epileptogenesis. *Epilepsy Behav.* 2008 Dec 17.

<sup>14</sup> Kaufmann WE, Krauss GL, Uematsu S, Lesser RP. Treatment of Epilepsy with Multiple Subpial Transections: An Acute Histologic Analysis in Humans Subjects. *Epilepsia* 37(4):342-352, 1996.

<sup>15</sup> Kral T, von Lehe M, Podlogar M, Clusmann H, Süßmann P, Kurthen M, Ubrach H, Schramm J. Focal cortical dysplasia: long term seizure outcome after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007, Aug;78(8):853-6.

<sup>16</sup> Leão A A P. Spreading Depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol.* 1944, 7(6):359-390.

- <sup>17</sup> Li MI, Fernandes PT, Boer HM, Prilipko L, Sander JW. Demonstration project on epilepsy in Brasil WHO/ILAE/IBE Global campaign against epilepsy. Arq. Neuropsiquiatr 2007,65(supl 1):1-4.
- <sup>18</sup> LIGA BRASILEIRA DE EPILEPSIA. Disponível em:  
<[http://www.epilepsia.org.br/epi2002/show\\_livro1.asp?cap=42](http://www.epilepsia.org.br/epi2002/show_livro1.asp?cap=42). Acesso em: 22 abr 2007
- <sup>19</sup> Morrell F, Hanbery JW. A New surgical technique for the treatment of focal cortical epilepsy. Electroencephalogram Clin Neurophysiol. 1969, 26:120.
- <sup>20</sup> Morrel F, Whisler WW, Bleck, TP. Multiple Subpial Transection: a new approach to the surgical treatment of focal epilepsy. J Neurosurg 1989; 70:231-239.
- <sup>21</sup> Mulligan LP, Spencer DD, Spencer SS. Multiple Subpial Transections: The Yale Experience. Epilepsia 2001; 42(2):226-229.
- <sup>22</sup> Orbach D, Romanelli P, Devinsky O, Doyle W. Late Seizure Recurrence after Multiple Subpial Transections. Epilepsia 2001, 42 (10): 1316–1319.
- <sup>23</sup> Paxinos, G & Watson, C The rat brain in stereotaxic coordinates. Orlando, FL, Academic Press. 1998.
- <sup>24</sup> Rooyen VF, Young NA, Larson SEM, Teskey GC. Hippocampal Kindling Leads to Motor Map Expansion. Epilepsia 2006; 47(8): 1383–1391.
- <sup>25</sup> Schramm J, Aliashkevich AF, Grunwald T. Multiple subpial transections: outcome and complications in 20 patients who did not undergo resection. J Neurosurg. 2002 97:39-47.

<sup>26</sup> Sharma V, Babu PP, Singh A, Singh S, Singh R Seizure. Iron-induced experimental cortical seizures: electroencephalographic mapping of seizure spread in the subcortical brain areas. *Seizure* 2007 Dec; 16(8):680-90.

<sup>27</sup> Wyler A, Wilkus RJ, Rostad SW, Vossler DG. Multiple Subpial Transections for Partial Seizures in Sensorimotor Cortex. *Neurosurgery* 1995, 37(6): 1122-1128.