NATASCHA CARDOSO DA FONSECA

**Estudo do perfil serotoninérgico no hipocampo de
pacientes com epilepsia do lobo temporal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientadora: Profa. Dra. Kette Dualibi Ramos
Valente

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fonseca, Natascha Cardoso da
Estudo do perfil serotoninérgico no hipocampo de
pacientes com epilepsia do lobo temporal /
Natascha Cardoso da Fonseca. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Psiquiatria.
Orientadora: Kette Dualibi Ramos Valente.

Descritores: 1.Serotonina 2.Receptores de
serotonina 3.Epilepsia do lobo temporal 4.Hipocampo
5.Western blotting 6.Cromatografia líquida de alta
pressão

USP/FM/DBD-297/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Márcia e Dimas (*in memoriam*), fonte de inspiração e base do que eu sou.

Aos meus filhos, Giovana e Gabriel, que me motivam e dão um sentido especial ao meu viver.

Ao meu esposo, Fabrício, companheiro e cúmplice desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Uma tese nasce de uma ideia e um esforço e ganha forma através da persistência e dedicação. Mas ela não é resultado do trabalho de apenas um, pois muitos são os que contribuem para a sua realização. Gostaria de agradecer a todos os envolvidos, que participaram, de forma direta ou indireta neste trabalho.

A minha orientadora, Prof. Dra. Kette Dualibi Ramos Valente, um exemplo de dedicação e competência no que faz. Obrigada pelo carinho, atenção e disponibilidade, me orientando e corrigindo (inúmeras vezes), sempre com muita paciência. Por ter sido mais que uma orientadora e professora, sempre compartilhando experiências profissionais e pessoais, com momentos agradáveis de conversas, conselhos, almoços e cafezinho.

A Helena, pelos ensinamentos, colaboração, disponibilidade e muita paciência comigo, mesmo nos momentos de total descoordenação. Pelo socorro e direcionamento, quando me aventurei neste mundo laboratorial, completamente diferente do rotineiro. Sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A Leda Talib, chefe do Laboratório (LIM 27), pela receptividade, ao receber uma intrusa no seu ambiente de trabalho; por todo o apoio e orientação no mundo laboratorial e da neurociência básica.

A toda a equipe e alunos do LIM27, local onde pude realizar este trabalho, por todo o aprendizado, e suporte necessário. Em especial, a Vanessa e Tamires, pelo auxílio nos momentos necessários; a Edvani, por ajudar a manter o laboratório em ordem após a minha bagunça.

A Silvia de Vincentiis, pela sabedoria e pelo suporte, ao compartilhar suas experiências e me ajudar, até em questões burocráticas, e pela generosidade de ceder seu banco de dados.

Aos amigos do Laboratório de Neurofisiologia Clínica: aos colegas e companheiros, Karenina Goldberg, Emanoella Faro e Rudá Alessi, pelas conversas e risadas, trazendo leveza e diversão aos momentos de aprendizado; a dra. Rosa Hassan e dra. Stella Tavares, pelos ensinamentos e companhia nos almoços; às funcionárias do Laboratório de Neurofisiologia Clínica Marly, Michelle e Célia, por todo o carinho e ajuda. Obrigada também a

amiga Karenina Goldberg, por, além do descrito, ter cedido suas atualizações ao banco de dados muito útil para este trabalho.

A Eliza Fukushima e Isabel Ataíde, secretárias da pós-graduação, pelo apoio e suporte administrativo.

Ao Bernardo dos Santos, pelas análises estatísticas e colaboração com minhas dúvidas de estatística.

Aos pacientes, por terem cedido um pouco de si, com a esperança de avanços no conhecimento científico, tornando possível a execução deste trabalho.

A minha família e amigos.

A Giovana e Gabriel, filhos maravilhosos, que me mostraram como amar e cuidar incondicionalmente. Obrigada pela paciência com os momentos ausentes pelo trabalho, por tornarem os meus dias mais felizes, a minha vida mais completa e por serem uma incrível razão de viver.

A Fabrício, marido e pai dedicado. Obrigada pelo amor e pela compreensão, por me estimular, apoiar e ajudar na realização deste trabalho; pela paciência e suporte nos momentos necessários de ausência pelo trabalho, cuidando dos nossos filhos e ajudando-os a compreender estes momentos.

A Márcia, por ser uma mãe dedicada e carinhosa, um referencial de mulher forte, dinâmica e competente. Obrigada por estar sempre presente e disponível (mesmo quando longe), me ajudando nos momentos mais difíceis; pelos conselhos e, também, pelas críticas, que sempre visaram o meu crescimento; por todo o amor incondicional, amor de mãe, que pude compreender melhor depois de ter me tornado uma.

A Dimas (*in memoriam*), por ter sido um pai presente e amoroso, um exemplo de honestidade e ética; por todos os conselhos, cuidado e proteção, por ter sido o porto seguro da família. Obrigada por instigar a fagulha do conhecimento, através de toda a sua curiosidade e interesse pela leitura e estudo; por me incentivar, mesmo nas decisões arriscadas. A falta é grande, mas sua presença será eterna em meu coração.

A meu irmão Tiago, por dar o exemplo e estímulo, ao ser o primeiro de “nós” a terminar uma pós-graduação. Obrigada a você, Dani e minha afilhada Bia, pelos momentos de alegria, descontração e muito amor.

A todos da família que sempre fizeram parte da minha vida: minha madrinha Ila, meus avós: Alice, Celina (*in memoriam*), Florêncio (*in memoriam*), João (*in memoriam*), tios, tias e primos. Obrigado a todos por todo carinho, amor e cuidado.

Aos meus sogros, Bernadete e Delírio, por compreenderem minhas escolhas e pela ajuda com as crianças, enquanto escrevia esta tese.

Aos amigos, distantes ou próximos, antigos ou novos; pelos momentos de lazer, desabafos e fuga da rotina.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

	Lista de abreviaturas e siglas.....	
	Lista de Figuras.....	
	Lista de Tabelas.....	
	Lista de Gráficos.....	
	Resumo.....	
	Summary.....	
1.0	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Epilepsia	02
1.2	Neurobiologia da Epilepsia.....	05
1.3	Epilepsia do Lobo Temporal e Esclerose Hipocampal.....	06
1.4	Epilepsia Temporal e Transtornos Psiquiátricos.....	09
1.5	Sistema Serotoninérgico.....	14
1.5.1	Serotonina.....	14
1.5.2	Receptores Serotoninérgicos.....	16
1.5.3	Transportador Serotoninérgico.....	19
1.5.4	Interação das vias monoaminérgicas.....	19
1.6	Atividade Serotoninérgica na Epilepsia.....	21
1.6.1	Modelos Animais.....	21
1.6.2	Estudos com Neuroimagem Funcional	28
1.6.3	Ensaio Clínicos	30
1.6.4	Estudos em Tecido Humano	31
1.7	Atividade Serotoninérgica nos Transtornos Psiquiátricos nos Pacientes com Epilepsia.....	34
2.0	JUSTIFICATIVA.....	37
3.0	OBJETIVOS.....	40
3.1	Objetivo Geral.....	41

3.2	Objetivos específicos.....	41
4.0	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1	Pacientes.....	43
4.1.1	Critérios de Inclusão.....	43
4.1.2	Critérios de Exclusão.....	44
4.1.3	Caracterização dos Pacientes.....	44
4.2	Cromatografia Líquida de Alta Pressão.....	47
4.2.1	Preparação do Hipocampo.....	47
4.2.2	Técnica de Análise.....	47
4.3	Western Blot.....	49
4.3.1	Preparação do Hipocampo.....	49
4.3.2	Técnica de Análise.....	49
4.4	Análise Estatística.....	52
4.5	Aspectos Éticos.....	53
5.0	RESULTADOS.....	54
5.1	Concentração de Serotonina.....	55
5.2	Densidade Receptores Serotoninérgicos.....	58
6.0	DISCUSSÃO.....	66
6.1	Variáveis Clínicas da Epilepsia.....	68
6.2	Transtorno Psiquiátrico.....	75
6.3	Limitações do estudo.....	77
7	CONCLUSÕES.....	79
8	ANEXOS.....	82
9	REFERÊNCIAS.....	124
	APÊNDICE.....	

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	serotonina
5-HTT	transportador de serotonina
[¹¹ C]WAY100635	[<i>carbonyl</i> - ¹¹ C]WAY-100635
¹⁸ F-FCWAY	¹⁸ F- <i>trans</i> -4-fluoro-N-2-[4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]ethyl-N(2-pyridyl)cyclohexanecarboxamide
([¹⁸ F]MPPF)	4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-(N-2"-pyridinyl)-p-[¹⁸ F]fluorobenzamido]ethylpiperazine
BZD	benzodiazepínico
CA	Corno de Amon
CBZ	carbamazepina
CTCG	crise tônico-clônico generalizada
DA	dopamina
DC	<i>detergent compatible</i>
DSM	<i>diagnostic and statistical manual of mental disorders</i>
DBA	<i>Dilute Brown Non-Agouti</i>
EH	esclerose hipocampal
ELT	epilepsia do lobo temporal
ELT-EH	epilepsia do lobo temporal por esclerose hipocampal
EME	estado de mal epiléptico
FAE	fármaco antiepiléptico
FLAIR	<i>fluid attenuation inversion recovery</i>
FLX	fluoxetina
GEPR	<i>genetic epilepsy prone rats</i>
GLM	modelo linear generalizado
HAL	haloperidol
HClO ₄	ácido perclórico
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HS	<i>hippocampal sclerosis</i>

ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
IRSN	inibidor de recaptação da serotonina e noradrenalina
ISRS	inibidor seletivo de recaptação da serotonina
LMT	lamotrigina
MPPF fluorobenzamido]	4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-(<i>N</i> -2-pirydynyl)- <i>p</i> - -ethyl-piperazine
MSO	metionina-sulfoximina
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NE	norepinefrina
OXC	oxcarbazepina
PET-CT	<i>positron emission tomography computerized tomography</i>
PHT	fenitoína
PB	fenobarbital
RISP	risperidona
SCID-4	structured clinical interview for the DSM-IV
SER	sertralina
SNC	sistema nervoso central
SUDEP	<i>sudden unexpected death syndrome</i>
T	Tesla
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline - tween (polysorbate 20)</i>
TCG	tônico-clônico generalizada
TLE	temporal lobe epilepsy
TP	transtorno psiquiátrico
TPM	topiramato
VPA	ácido valpróico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização dos pacientes.....	45
Tabela 2	Média de 5-HT nos pacientes com e sem história de CTCG.	55
Tabela 3	Modelo linear com distribuição gama analisando interferência do uso de antipsicóticos e duração da epilepsia na densidade do receptor 5-HT1A.....	60
Tabela 4	Análise de densidade receptor 5-HT6 nos pacientes com e sem história de EME.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Membrana de nitrocelulose após utilização do Ponceau.....	50
Figura 2	Amostra de membrana incubada com 5-HTT.....	52
Figura 3	Cromatograma de paciente com e sem história de CTCG. Acima: paciente com história de CTCG. Acima: paciente sem história de CTCG. Pico de 5-HT em 5,4 minutos e pico de padrão externo de 7,6 minutos. Concentração de 5-HT (área preenchida em verde) no primeiro de 0,173 ng/mg e, no segundo, de 0,256 ng/mg.....	56
Figura 4	Amostras de membranas incubadas com anticorpo anti-receptor 5-HT1A, comparando paciente com diferentes durações de epilepsia.....	59
Figura 5	Amostras de membranas incubadas com anticorpo anti-receptor 5-HT6, comparando a densidade do receptor entre pacientes com e sem história de EME.	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Caracterização dos pacientes.....	47
Gráfico 2	Níveis de dispersão da concentração de serotonina.....	55
Gráfico 3	Concentração de 5-HT entre pacientes com e sem história de CTCG.....	60
Gráfico 4	Gráfico de dispersão entre o receptor 5-HT1A e a duração da epilepsia.....	62

RESUMO

Fonseca NC. *Estudo do perfil serotoninérgico no hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A epilepsia é a condição crônica mais prevalente dentre as doenças neurológicas, associada com taxas significativas de morbidade e mortalidade. Pacientes com epilepsia farmacorresistente possuem uma taxa de mortalidade 2 a 3 vezes maior que indivíduos sem epilepsia. A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a principal causa de epilepsia farmacorresistente nos adultos e também o protótipo da epilepsia cirurgicamente tratável, portanto, com uma maior acessibilidade para estudo de possíveis mecanismos epileptogênicos. Esclerose hipocampal (EH) é o achado neuropatológico mais comum em pacientes com ELT. Evidências, baseadas em experimentos animais e estudos em humanos, sugerem que as vias serotoninérgicas desempenham um importante papel na epileptogênese. Pacientes com ELT, causadas pela EH, apresentam uma maior prevalência de transtornos do humor e psicose contribuindo para uma pior qualidade de vida, com consequente impacto negativo nas respostas terapêuticas farmacológicas e cirúrgicas. Além disso, alguns estudos sugerem a existência de um mecanismo patogênico operante comum entre estas condições. Portanto, esta é um importante variável para análise. O objetivo desse estudo foi correlacionar as variáveis clínicas da epilepsia e a presença de transtornos psiquiátricos coexistentes com a concentração de serotonina (5-HT), a densidade dos receptores serotoninérgicos e a densidade do transportador serotoninérgico (5-HTT) no hipocampo dos pacientes com ELT-EH, que foram submetidos à cirurgia devido à presença de epilepsia farmacorresistente. Foram avaliadas amostras de 44 hipocampus de pacientes cirurgicamente tratados para ELT-EH. A concentração de 5-HT foi avaliada por cromatografia líquida de alta pressão

(HPLC) com detecção por fluorescência. 5-HTT e os receptores serotoninérgicos 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT6 e 5-HT7 foram avaliados por *Western Blot*. Níveis mais baixos de concentração de 5-HT estiveram associados com a presença de crises TCG (*Wilcoxon-Mann-Whitney*; $p = 0.019$). A densidade aumentada do receptor 5-HT1A esteve associada com maior duração da epilepsia (coeficiente de correlação de *Spearman*: $p = 0.040$) e a densidade diminuída do receptor 5-HT6 esteve associado com presença de EME (*Wilcoxon-Mann-Whitney*: $p = 0.0027$). A densidade dos receptores 5-HT2A e 5-HT7 e do 5-HTT não estiveram associadas com variáveis clínicas da epilepsia. A concentração de 5-HT, a densidade dos receptores e a densidade de 5-HTT não estiveram associadas à presença dos transtornos psiquiátricos neste grupo de pacientes. Nossos achados sugerem que as vias serotoninérgicas estão associadas com mecanismos de epileptogênese. Não foi evidenciado associações entre as vias serotoninérgicas e a presença de comorbidades psiquiátricas neste grupo de pacientes com ELT-EH.

Descritores: serotonina; receptores de serotonina; epilepsia do lobo temporal; hipocampo; western blotting; cromatografia líquida de alta pressão.

SUMMARY

Da Fonseca NC. *Study of serotonergic profile in temporal lobe epilepsy patients' hippocampus* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Epilepsy is the most prevalent neurological condition and it is associated with significative morbidities and mortalities rates. Patients with refractory epilepsy have a 2- to 3-fold higher mortality rate than people without epilepsy. Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common form of adult drug-resistant epilepsy. It is also the prototype of a surgically treatable epilepsy and because of that it is the most accessible for studies focused in epileptogenesis. Hippocampal sclerosis (HS) is the most common neuropathological finding in patients with TLE. Evidences from experimental, clinical and image studies suggest that the serotonergic system play an important role in epileptogenesis. Patients with TLE-HS have a higher prevalence of mood disorder and psychosis contributing for a worse quality of life with and consequent negative impact in pharmacological and surgical responses. Furthermore, studies suggest a common pathogenic mechanism operant in both conditions. Therefore, this is an important analytical variable. The objective of this study was to correlate clinical variables of epilepsy and the presence of psychiatric disease with serotonin (5-HT) concentration, serotonergic receptor density and serotonergic transporter (5-HTT) density in the hippocampus of TLE-HS patients submitted for surgery due to refractory epilepsy. It was analyzed 44 hippocampal tissue samples from surgical treated TLE-HS patients. 5-HT concentration was assessed by high pressure liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. 5-HTT and serotonergic receptors 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT6 and 5-HT7 were assessed by Western Blotting. Lower levels of 5-HT concentration were associated with the presence of generalized tonic-clonic seizures (*Wilcoxon-Mann-Whitney*; $p = 0.019$). A higher 5-HT1A receptor density was associated with longer epilepsy duration (*Spearman correlation coefficient*: $p = 0.040$). Lower 5-HT6 receptor density was associated with the presence of

status epilepticus (*Wilcoxon-Mann-Whitney*: $p = 0.0027$). 5-HT_{2A} receptor, 5-HT₇ receptor and 5-HTT densities were not associated with clinical variables of epilepsy. 5-HT concentration, serotonergic receptors and transporter densities were not associated with the presence of psychiatric disease in this group of patients. Our findings suggest that the serotonergic pathways are associated with epileptogenesis mechanisms. It was not evidenced any association between serotonergic pathways and psychiatric comorbidities in this group of TLE-HS patients.

Descriptors: serotonin; receptors, serotonin; epilepsy, temporal lobe; hippocampus; blotting, western; chromatography, high pressure liquid.

1. INTRODUÇÃO

“A condição médica da Epilepsia é tão antiga quanto a existência humana” (Magiorkinis *et al.*, 2010).

As crises epiléticas e a epilepsia já foram descritas desde a Antiguidade, com relatos de até 2.000 anos antes de Cristo (Magiorkinis *et al.*, 2010). Entretanto, somente com os avanços da medicina, a partir do século 18 e 19, as crenças e superstições religiosas foram abandonadas e deu-se o início do desenvolvimento da neurobiologia e das pesquisas sobre epilepsia (Magiorkinis *et al.*, 2014). Hughlings Jackson (1835 – 1911) introduziu a base científica da epileptogênese e do conceito moderno de epilepsia, caracterizando a crise epilética como um evento desencadeado por uma descarga elétrica excessiva e súbita proveniente do córtex cerebral (Magiorkinis *et al.*, 2014).

1.1 Epilepsia

A epilepsia é a condição crônica mais prevalente dentre as doenças neurológicas, associada com taxas significativas de morbidade e mortalidade. Apresenta uma prevalência aproximada de 4.3 a 7.2 para 1.000 em relação à população geral; com taxas mais elevadas, entre 10 para 1.000, nos países de baixa renda; e uma incidência entre 43 a 47 para 100.000 pessoas/ ano (Ablah *et al.*, 2014; Giussani *et al.*, 2014; Steer *et al.*, 2014; Moshé *et al.*, 2015). A taxa de mortalidade nos países de alta renda varia de 2 a 5 vezes em relação à

população geral, sendo maior nos primeiros anos após o diagnóstico da epilepsia (taxa de mortalidade prematura); chegando a aproximadamente 11 comparada à população geral. Além disto, nos países de baixa renda, essa taxa pode aumentar significativamente (até 37 vezes) (Moshé *et al.*, 2015). Nos pacientes com epilepsia, a taxa de mortalidade é maior nos pacientes que apresentam crises tônico-clônicas generalizadas com início focal (Rakitin *et al.*, 2011).

O diagnóstico de epilepsia, de acordo com a proposta atual da *International League Against Epilepsy - ILAE* (Fisher *et al.*, 2014), é definido por um dos seguintes critérios: 1. Pelo menos duas crises epiléticas não provocadas ou reflexas ocorrendo com uma diferença de tempo > 24 horas; 2. Uma crise epilética não provocada ou reflexa e uma probabilidade de novas crises epiléticas semelhante ao risco geral de recorrência (pelo menos de 60%) após duas crises não provocadas; 3. Diagnóstico de uma síndrome epilética.

A epilepsia é considerada farmacorresistente quando não houver controle das crises epiléticas, isto é, uma ou mais crises por mês, após tratamento com dois ou mais fármacos antiepiléticos (FAEs), adequadamente escolhidos e em doses máximas toleradas, seja em monoterapia ou de forma combinada (Beleza, 2009; Kwan e Sperling, 2009; Kwan *et al.*, 2010).

Os pacientes com epilepsia farmacorresistente possuem uma taxa de mortalidade 2 a 3 vezes maior do que os indivíduos sem epilepsia, sendo o fenômeno da morte súbita e inesperada na epilepsia (SUDEP) a principal causa de morte nesses pacientes, representando 7,5 a 17% de todas as mortes em epilepsia (Scorza e Tucci, 2015) e estando associada com um

aumento de 20 vezes do risco de morte súbita e inesperada nos pacientes com epilepsia (Kanner, 2013).

Pacientes que não são responsivos ao tratamento com dois FAEs apropriados têm uma chance de resolução das crises com uma futura medicação em torno de 5 a 10% ao ano, sendo que esta remissão ainda pode não ser duradoura. Em contrapartida, nos pacientes apropriadamente indicados, mais de 70% apresentam uma resolução duradoura das crises epiléticas com o tratamento cirúrgico (Kwan e Sperling, 2009). Sendo assim, nos casos de epilepsia farmacorresistente confirmada, deve-se avaliar se a condição epilética se enquadra como cirurgicamente tratável e considerar as opções cirúrgicas disponíveis para o caso (Schmidt, 2009).

A cirurgia de epilepsia parece ser um tratamento igualmente eficaz para pacientes com epilepsia farmacorresistente de diferentes idades, sexo e lateralidade do foco epilético; com idade variando de 10 a 60 anos e com incidências semelhantes entre os sexos e a lateralidade (Englot *et al.*, 2013; Gonçalves-Ferreira *et al.*, 2013; Josephson *et al.*, 2013; Vannemreddy *et al.*, 2013). É observado um resultado satisfatório de longo prazo no controle das crises epiléticas nos pacientes com epilepsia farmacorresistente submetidos ao procedimento cirúrgico, incluindo pacientes com ELT-EH (Dorfer *et al.*, 2017; Krucoff *et al.*, 2017; Holm *et al.*, 2018), além de redução do risco de mortalidade prematura (Seymour *et al.*, 2012).

1.2 Neurobiologia da Epilepsia

A epileptogênese se refere ao desenvolvimento da epilepsia, ou seja, a sequência de eventos que culminam na predisposição de um cérebro para apresentar crises epiléticas (Scharfman, 2007). Está relacionado com um processo crônico, no qual ocorrem uma série de mudanças bioquímicas e estruturais no tecido nervoso (Sendrowski e Sobaniec, 2013). É o processo que associa injúrias cerebrais ou outros fatores de risco a um subsequente aparecimento da epilepsia (Goldberg e Coulter, 2013). Na epilepsia, assume-se que um grupo de neurônios se tornam hiperexcitáveis, favorecendo o aparecimento de descargas anormais (Scharfman, 2007).

A epileptogênese é constituída por três fases: a primeira caracterizada por um insulto inicial ou uma lesão cerebral aguda; a segunda caracterizada por um período de maturação do foco epilético e a última fase caracterizada pela instalação da epilepsia. Estes mecanismos epileptogênicos resultam em uma redução do limiar convulsivo, até que a crise epilética ocorre em resposta a fatores precipitantes (Engel *et al.*, 2013; Sendrowski e Sobaniec, 2013).

Acredita-se que os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da epilepsia sejam multifatoriais, e que a epileptogenicidade, ou seja, a probabilidade de uma crise epilética ocorrer, não seja estática, sendo que o grau de epileptogenicidade pode variar com o tempo (Engel *et al.*, 2013).

1.3 Epilepsia do Lobo Temporal e Esclerose Hipocampal

A ELT é o tipo mais frequente de epilepsia sintomática do adulto. O lobo temporal é a estrutura mais epileptogênica do cérebro, sendo a maioria das crises temporais originados das estruturas mesiais e envolvendo predominantemente uma desregulação hipocampal, gerada por uma hiperexcitabilidade neuronal (Fisher *et al.*, 1998; Tatum, 2012). Na ELT-EH, as crises se caracterizam por início com sensações víscero-sensoriais (em especial mal-estar epigástrico), medo, ansiedade, sensações dismnésticas, como *deja vu* ou *jamaís vu*, ou mais raramente alucinações gustativas e olfativas. Em seguida, se observa uma parada comportamental e alterações variáveis da perceptividade; podendo o paciente apresentar olhar fixo e perda parcial ou completa da responsividade. Os automatismos orofaciais e manuais são comumente observados, com ocasional postura distônica contralateral ao hemisfério de origem das crises epiléticas; não sendo comum a generalização secundária destas. Outras características comuns são crises com duração prolongada e presença de algum grau de disfunção cognitiva e de linguagem pós-ictal (Andrade-Valença *et al.*, 2006; Malmgren e Thom, 2012)).

Aproximadamente 60% dos casos de ELT são causados pela esclerose de hipocampo (EH), com elevada proporção de pacientes com crises fármacorresistentes (Andrade-Valença *et al.*, 2006). Dos casos com ELT submetidos à cirurgia de epilepsia, a incidência de EH é de aproximadamente 33 a 48% (Blümcke, 2009; Blümcke *et al.*, 2012; Blümcke *et al.*, 2013).

A etiologia da EH ainda não está bem esclarecida. Acredita-se que ela seja multifatorial; possivelmente ocorrendo secundária a uma susceptibilidade

genética, associado a outros fatores. A ELT-EH é tipicamente considerada como um transtorno adquirido, resultado de insulto a um cérebro previamente normal (Goldberg e Coulter, 2013). A ELT-EH induzida pode ser causada por crises febris prolongadas, entretanto, esta evolução com atrofia hipocampal ocorre na minoria dos casos. Além disto, há a forma familiar de ELT, cuja etiologia é presumidamente genética (Goldberg e Coulter, 2013). Portanto, este ainda é um assunto controverso (Thom, 2014).

A formação hipocampal é uma estrutura anatômica com três camadas de alocórtex com uma organização lamelar, compreendendo o giro denteado, o hipocampo propriamente dito e o subículo. O hipocampo faz parte do sistema límbico, com um papel fundamental nos processos emocionais, comportamentais e de memória. O hipocampo, propriamente dito, também conhecido como corno de Amon (CA), está localizado na face mesial do lobo temporal e pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda. Histologicamente, seu córtex pode ser dividido em quatro setores: CA1 a CA4 (Sendrowski e Sobaniec, 2013). O setor CA1 corresponde a maior parte da camada de células piramidais, com seus neurônios amplamente distribuídos, estando em continuidade com o subículo. O setor CA2 é o mais estreito e com neurônios densamente distribuídos. O setor CA3 apresenta neurônios em arranjo radial formam a curva do hipocampo e o setor CA4 se localiza dentro da concavidade do giro denteado, compreendendo neurônios grandes, como as células ovoides. As regiões CA3 e CA4 recebem numerosos axônios das células granulares do giro denteado, chamadas fibras musgosas (Malmgren e Thom, 2012).

O achado característico da EH é uma perda segmentar dos neurônios piramidais, associada com um padrão grave de gliose dos astrócitos. De acordo com a *ILAE* (Blümcke *et al.*, 2013) ela pode ser dividida em 3 diferentes subtipos histopatológicos:

- Tipo I: o segmento CA1 do hipocampo é mais gravemente afetado, com perda neuronal em > 80%. Outros segmentos também apresentam perdas neuronais significativas, afetando 30 a 50% dos neurônios piramidais do segmento CA2; 30 a 90% dos neurônios no segmento CA3 e 40 - 90% no segmento CA4. Além disto, o giro denteado geralmente apresenta uma perda em torno de 50 - 60% de células granulares. Este é o tipo mais comum de EH, presente em 60 - 80% dos casos de ELT cirurgicamente tratados.
- Tipo II: perda neuronal predominante no segmento CA1, em torno de 80%, com os outros segmentos demonstrando uma perda celular leve, apenas evidenciada por análise qualitativa; sendo no segmento CA2 e CA3 <20% e no segmento CA4 < 25%. Este tipo é incomum, sendo observado em 5 a 10% dos casos de ELT.
- Tipo III: perda neuronal predominante no segmento CA4, de aproximadamente 50%, e no giro denteado, em torno de 35%. Os demais segmentos demonstram uma perda de: CA1 <20%, CA2 <25% e CA3 <30%. Também um tipo raro de EH, evidenciada em cerca de 4 - 7.4% dos casos.

O diagnóstico de EH é realizado através da avaliação com ressonância magnética de encéfalo, sendo caracterizado predominantemente pela atrofia hipocampal nas imagens ponderadas em T1 e hipersinal hipocampal nas

imagens ponderadas em T2 (Camacho e Castillo, 2007; Menzler *et al.*, 2010; Blümcke *et al.*, 2013).

Embora alguns casos de ELT-EH evoluam com crises epiléticas controladas ou pouco frequentes, muitos dos pacientes são farmacorresistentes. Nestes pacientes, o tratamento cirúrgico pode ser uma boa opção terapêutica, com relatos do controle das crises epiléticas em 2/3 dos pacientes, nos 2 a 3 primeiros anos e 57% em 5 anos (Thom, 2014).

O sucesso cirúrgico depende da remoção da área epileptogênica no lobo temporal (Sagher *et al.*, 2012); sendo o objetivo cirúrgico que isso ocorra sem causar déficits neurológicos permanentes (Beleza, 2009). Já foram desenvolvidas diferentes abordagens para acesso à região mesial temporal, sendo a lobectomia temporal anteromesial e a amigdalohipocampectomia seletiva as técnicas preferencialmente utilizadas (Sagher *et al.*, 2012).

A lobectomia temporal anteromesial consiste na ressecção limitada da porção anterior e neocortical do lobo temporal e a ressecção mais extensa das estruturas temporais mesiais (amígdala, hipocampo e giro parahipocampal). Alternativamente, pode ser realizada uma cirurgia mais seletiva denominada amigdalohipocampectomia, preservando ao máximo o neocórtex temporal (Sagher *et al.*, 2012; Gonçalves-Ferreira *et al.*, 2013; Josephson *et al.*, 2013).

1.4 Epilepsia Temporal e Transtornos Psiquiátricos

A prevalência dos transtornos psiquiátricos nos pacientes com epilepsia varia amplamente, com taxas entre 19 a 80%. A maior prevalência é observada nos pacientes em avaliação pré-cirúrgica referidos aos centros

terciários e a menor nos estudos populacionais. A grande variabilidade pode ser explicada pela grande heterogeneidade dos estudos. Entretanto, apesar disso, há um consenso de que os distúrbios psiquiátricos são mais prevalentes nos pacientes com epilepsia (García-Morales et al., 2008).

Em um estudo populacional, realizado no Canadá, foi identificada uma prevalência da presença de transtorno psiquiátrico nos pacientes com epilepsia de 23.5% em 12 meses e 35,5%, ao longo da vida, sendo as prevalências ao longo da vida de 24,4% para transtornos do humor, 17,4% para transtorno depressivo maior, 22,8% para distúrbios de ansiedade e 6,6% de síndrome do pânico ou agorafobia; além de uma taxa de ideação suicida de 25%, para pacientes com epilepsia e 13.3% naqueles sem epilepsia (Tellez-Zenteno et al., 2007).

Num estudo de revisão não sistemática da literatura, os transtornos depressivos representaram a comorbidade psiquiátrica mais frequente nos pacientes com epilepsia (30%), seguido por transtornos de ansiedade (10 - 25%), transtornos psicóticos (2 - 7%) e transtornos de personalidade (1 - 2%)(Gaitatzis et al., 2004).

As comorbidades psiquiátricas são mais frequentes nas epilepsias focais, em especial na ELT, com taxas de prevalência de depressão, ansiedade e psicose significativamente maiores, quando comparadas a outros tipos de epilepsia (Perini et al., 1996; Matsuura et al., 2003).

Pacientes com ELT- EH apresentam uma maior prevalência de transtornos do humor e psicose (Briellmann *et al.*, 2007; D'alessio *et al.*, 2009;

Gonçalves e Cendes, 2011) com consequente impacto negativo nas respostas terapêuticas farmacológicas e cirúrgicas.

Segundo Hitiris *et al.* (2007), a presença de transtorno psiquiátrico pode ser um fator preditivo de farmacorresistência. A depressão representou 85% dos diagnósticos psiquiátricos, em pacientes com epilepsia seguidos por 20 anos, e foi associada, por si só, como um fator de risco para pior resposta.

Kanner *et al.* (2009) demonstraram que o histórico de depressão crônica foi um preditivo de pior resposta ao tratamento cirúrgico considerando-se a remissão das crises epiléticas, após o seguimento de 100 pacientes com ELT-EH submetidos à lobectomia temporal anterior, com um período de acompanhamento médio de 8.3 ± 3.3 anos.

Koch-Stoecker *et al.* (2017) encontraram que as taxas de controle das crises nos pacientes submetidos à ressecção do lobo temporal, para tratamento da epilepsia, foram significativamente maiores nos pacientes com epilepsia sem transtornos psiquiátricos associados, quando comparados com pacientes com epilepsia e à presença de transtornos psiquiátricos (depressão, psicose e/ou transtornos de personalidade).

A presença de transtornos psiquiátricos representa um fator de risco independente para uma pior qualidade de vida nos pacientes com epilepsia (Anhoury *et al.*, 2000; Aydemir *et al.*, 2004; Pugh *et al.*, 2005). Além disso, as comorbidades psiquiátricas associadas com maior risco de suicídio são relativamente frequentes nos pacientes com epilepsia, sendo o suicídio responsável por 12% das mortes prematuras desse grupo (Kanner, 2013).

Fazel *et al.* (2013), em um estudo populacional realizado na Suécia, observou que a mortalidade prematura era aproximadamente 11 vezes mais

frequente nos pacientes com epilepsia, quando comparados com a população geral e com irmãos saudáveis. As chances de morte prematura por causas externas, que incluíam suicídio e acidentes, foi 3 vezes maior nos pacientes com epilepsia. Nos pacientes com epilepsia que tiveram morte prematura por causas externas, comorbidades psiquiátricas foram documentadas em aproximadamente 75%, sendo a depressão e o abuso de substâncias as principais comorbidades encontradas.

Os transtornos psiquiátricos frequentemente se apresentam de forma diferenciada nos pacientes com epilepsia quando comparados a pacientes sem epilepsia, apresentando uma estreita relação entre o aparecimento dos sintomas psiquiátricos com a ocorrência de crises epiléticas. Por conta disto, os sintomas psiquiátricos podem ser classificados em relacionados ao evento ictal (pré-ictais, ictais e pós ictais) e interictais. Os sintomas pré-ictais são aqueles que aparecem precedendo uma crise epilética em até 2 dias; os sintomas interictais são aqueles que estão presentes independente da presença de crises; os ictais são aqueles que aparecem como manifestação da crise epilética e os pós ictais os que ocorrem dentro dos cinco dias após uma crise epilética (García-Morales *et al.*, 2008; Kanner, 2009).

A etiologia das comorbidades psiquiátricas nos pacientes com epilepsia é multifatorial, envolvendo fatores neurobiológicos e psicossociais (Kanner, 2005; 2009).

Os determinantes neurobiológicos incluem a idade de início da epilepsia, a frequência e a gravidade das crises epiléticas, o tipo de epilepsia, a localização do foco epilético e as medicações em uso, tendo em consideração tanto o tipo, quanto o número (Kanner, 2005; 2008).

Os possíveis fatores psicossociais incluem estigma percebido, número elevado de eventos estressores prévios, não aceitação da epilepsia, estresse financeiro, problemas profissionais e início precoce da epilepsia (Kanner, 2008; 2009).

Vários estudos mais demonstram uma relação bidirecional entre epilepsia e os transtornos psiquiátricos (Kanner, 2005; Pineda *et al.*, 2010; Kanner, 2011). Os transtornos depressivos não são restritos aos pacientes com crises epiléticas farmacorresistentes e, frequentemente, precedem o início das crises (Forsgren e Nyström, 1990; Hesdorffer *et al.*, 2000). Além disto, não somente pessoas com epilepsia têm maior risco de desenvolver transtornos depressivos, mas pacientes com transtornos depressivos têm chances 3 a 7 vezes maiores de desenvolver epilepsia (Forsgren e Nyström, 1990; Hesdorffer *et al.*, 2000; Hesdorffer *et al.*, 2006).

Estudos com modelos animais, neuroimagem funcional e post-mortem em humanos sugerem a existência de um mecanismo patogênico operante comum entre estas condições (Cheetham *et al.*, 1990; Stockmeier *et al.*, 1998; Toczek *et al.*, 2003; Savic *et al.*, 2004; Lothe *et al.*, 2008; Kandratavicius *et al.*, 2013). Os mecanismos patológicos comuns incluem anormalidades no potencial de ligação de receptores de diversos neurotransmissores do sistema nervoso central (SNC), especialmente os de serotonina e anormalidades funcionais nos lobos temporais e frontais, incluindo diminuição de receptores de 5-HT nas estruturas mesiais, núcleo da rafe, tálamo e giro cíngulo (Drevets *et al.*, 1999; Sargent *et al.*, 2000; Kanner, 2005; Hasler *et al.*, 2007; Kanner, 2009; 2011).

1.5 Sistema Serotoninérgico

O sistema de neurotransmissão serotoninérgica é constituído por grupos morfológicamente heterogêneos de neurônios localizados no tronco encefálico, predominantemente nos núcleos da rafe, e apresentam um sistema axonal complexo, que inerva virtualmente todas as regiões do SNC; formando um sistema com projeções difusamente organizados (Törk, 1990).

Esse sistema difuso de inervação do sistema serotoninérgico, explica porque a 5-HT e seus receptores são importantes na regulação de virtualmente todas as funções cerebrais e, também, porque as alterações na regulação das suas vias já foram associadas à patogênese de diversos transtornos neurológicos e psiquiátricos (Mann, 1999; Berger *et al.*, 2009).

1.5.1 Serotonina

A 5-HT é uma indolamina massivamente sintetizada no trato gastrointestinal, predominantemente pelas células enterocromafins, com uma pequena porcentagem sintetizada no SNC. Apesar disto e do fato de também exercer um papel na agregação plaquetária, motilidade intestinal, dentre outras possíveis funções, a sua função primordial é a de neurotransmissão (Mann, 1999; Charnay e Léger, 2010; Lv e Liu, 2017). A 5-HT é um neurotransmissor monoaminérgico sintetizado no núcleo da rafe do tronco encefálico, a partir do aminoácido essencial triptofano (Alenina e Klempin, 2015). Aproximadamente

30 a 80% dos neurônios do núcleo da rafe sintetizam 5-HT (Hecimovic *et al.*, 2001).

Após sua síntese, a 5-HT é armazenada em vesículas sinápticas e carregadas, pelas fibras serotoninérgicas ascendentes para regiões corticais, límbicas e do tronco encefálico, incluindo a formação hipocampal (Berger *et al.*, 2009; Alenina e Klempin, 2015). O hipocampo, assim como todo o sistema límbico, é o principal alvo das vias aferentes serotoninérgicas (Berumen *et al.*, 2012). As vias serotoninérgicas da rafe-hipocampo desempenham um papel importante na regulação do humor (Carr e Lucki, 2011). A principal teoria neurobiológica da depressão, a clássica “hipótese monoaminérgica da depressão”, associa uma alteração da neurotransmissão monoaminérgica, com depleção de serotonina, noradrenalina e dopamina, como uma das principais causas os sintomas depressivos (Köhler *et al.*, 2016; Ferrari e Villa, 2017).

A liberação da 5-HT pelos neurônios da rafe é regulada por mecanismos intrínsecos e extrínsecos. O mecanismo mais eficiente consiste na alça curta (feedback) auto inibitória que envolve receptores somatodendríticos 5-HT_{1A}. A ativação dos autorreceptores 5-HT_{1A} da rafe pela liberação local de 5-HT inibe a descarga de neurônios serotoninérgicos e posterior liberação do neurotransmissor (Carr e Lucki, 2011).

As monoaminas, como a 5-HT, produzem seus efeitos induzindo mudanças bioquímicas complexas nos neurônios pós-sinápticos do SNC, através da interação com proteínas sinalizadoras - proteína G - dentro da membrana celular pós-sináptica (Carr e Lucki, 2011).

1.5.2 Receptores Serotoninérgicos

Todas as regiões encefálicas expressam múltiplos receptores serotoninérgicos, sendo que cada neurônio pode expressar múltiplos tipos de receptores serotoninérgicos (Berger *et al.*, 2009). Todas famílias de receptores serotoninérgicos estão expressas no hipocampo (Berumen *et al.*, 2012).

Os receptores serotoninérgicos são os mais numerosos e diversos do sistema dos receptores de transmissão monoaminérgica. Atualmente, sete famílias distintas de receptores serotoninérgicos já foram identificadas (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇) e inúmeras subpopulações já foram descritas. Os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ já foram associados à regulação do humor e relacionados a transtornos psiquiátricos (Pytliak *et al.*, 2011).

Os receptores 5-HT₁ são subdivididos em 5 subgrupos: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F}. Eles são, em sua maioria, porém não exclusivamente, associados com proteínas Gi/G₀ e inibem a produção de AMPc (Pytliak *et al.*, 2011).

Os receptores 5-HT_{1A} são os mais amplamente distribuídos de todos os receptores serotoninérgicos. No SNC, os receptores 5-HT_{1A} estão presentes em maior densidade no córtex cerebral, hipocampo, septo, amígdala e núcleo da rafe. No SNC, eles agem como autorreceptores e receptores polissinápticos. No córtex, estes agem como autorreceptores, bem como receptores polissinápticos. Estes receptores estão envolvidos na inibição da descarga de neurônios, regulação da produção de ACTH e regulação do

comportamento e fome (Wang *et al.*, 2009), sendo que, possivelmente, desempenham um papel importante no desenvolvimento da ansiedade (Klemenhagen *et al.*, 2006), o que é corroborado pelo uso de antagonistas do receptor 5-HT_{1A} no tratamento da ansiedade e depressão.

Os receptores 5-HT₂ são subdivididos em 3 classes: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}. Estes são os principais subtipos de receptores excitatórios entre os receptores acoplados à proteína G para 5-HT. Entretanto, o receptor 5-HT_{2A} pode ter um efeito inibitório em certas áreas, como o córtex visual e orbitofrontal (Pytliak *et al.*, 2011).

Os receptores 5-HT_{2A} são expressos em muitos tecidos centrais e periféricos. No SNC, os receptores 5-HT_{2A} estão presentes principalmente no córtex, claustró e gânglios da base (Pytliak *et al.*, 2011). Sua ativação no córtex pré-frontal, região cujo metabolismo está alterado nos pacientes com esquizofrenia, modula a liberação de dopamina e GABA (Feng *et al.*, 2001; Bortolozzi *et al.*, 2005). Antagonistas do receptor 5-HT_{2A}, com diferentes sítios de afinidade (como risperidona, seroquel, olanzapina), são utilizados no tratamento da esquizofrenia, e já foram relacionados com a presença de sintomas obsessivos compulsivos nestes pacientes (Kim *et al.*, 2009).

O receptor 5-HT₆ está localizado predominantemente no encéfalo, onde está acoplado ao estímulo de uma adenil ciclase (Carr e Lucki, 2011). Duas variantes do receptor 5-HT₆ já foram descritas. A variante completa é composta por 440 aminoácidos e predomina nas áreas límbicas e nas zonas cerebrais extrapiramidais. A segunda variante possivelmente resulta de uma deleção da primeira, contendo 286 aminoácidos e predominando no caudado e substância negra. A importância clínica exata dos receptores 5-HT₆ permanece

ainda incerta (Pytliak *et al.*, 2011). Existem evidências que este receptor regula a liberação de inúmeros neurotransmissores, como a acetilcolina, norepinefrina, ácido gaba-aminobutírico e dopamina, que proveem um mecanismo adicional para sua possível efetividade no tratamento de transtornos psiquiátricos. Inúmeros antidepressivos (amitriptilina, imipramina, doxepina) e alguns antipsicóticos atípicos (olanzapina, quetiapina, clozapina) agem como antagonistas dos receptores 5-HT₆, embora sem seletividade, sugerindo uma possível associação entre estes receptores e certos transtornos psiquiátricos.

Os receptores 5-HT₇ são compostos por 445 aminoácidos e aumentam a ativação da Adenil ciclase via proteína Gs. Ele também ativa a AMP quinase. Existem 5 isoformas do receptor (5-HT_{7A-D}), que diferem entre si pelo seu terminal C (Pytliak *et al.*, 2011). Três destas variantes foram identificadas em humanos, designadas como 5-HT_{7a}, 5-HT_{7b} e 5-HT_{7c} (Leopoldo *et al.*, 2011). Todos exibem as mesmas propriedades farmacológicas e são expressos em vasos, músculos lisos extravasculares e SNC. Antipsicóticos atípicos, como a clozapina, e antidepressivos possuem grande afinidade por receptores 5-HT₇. Antagonistas dos receptores 5-HT₇ mimetizam efeitos dos inibidores seletivos de recaptação da 5-HT e podem ser aplicados no tratamento da depressão e transtornos do sono (Mnie-Filali *et al.*, 2007). No estudo de Witkin *et al.* (Witkin *et al.*, 2007), realizado com ratos deficientes de receptor 5-HT₇, os autores demonstraram que estes ratos possuíam uma redução do limiar para crises epiléticas, quando comparados a ratos selvagens.

1.5.3 Transportador Serotoninérgico

O transportador serotoninérgico (5-HTT) age como o primeiro mecanismo de remoção de 5-HT da fenda sináptica, ação essa dependente de ATP (Veenstra-Vanderweele *et al.*, 2000; Charnay e Léger, 2010). No SNC, o 5-HTT é o mecanismo controlador predominante da intensidade e duração da neurotransmissão serotoninérgica (Daws e Gould, 2011). Ele se localiza nos terminais pré-sinápticos de células do SNC, bem como em axônios e corpos celulares de células serotoninérgicas da rafe. Os antidepressivos tricíclicos e os inibidores de recaptção de 5-HT desempenham como um de seus mecanismos de ação a inibição do transportador de 5-HT, efeito corroborado por estudo com Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (PET-CT) nos pacientes com transtorno depressivo maior (Lundberg *et al.*, 2012).

O gene humano do 5-HTT está localizado no cromossoma 17q11.1-q12 e consiste em 14 exons. Diversos polimorfismos do gene do 5-HTT já foram relatados como associados com transtornos psiquiátricos, além de ELT (Manna *et al.*, 2007; Charnay e Léger, 2010).

1.5.4 Interação das vias monoaminérgicas

Estudos demonstram evidências de que as vias de neurotransmissão monoaminérgica que envolvem a 5-HT, norepinefrina (NE) e a dopamina (DA) exercem um papel na regulação da cognição, do humor, das emoções, dentre

outros. Essas vias formam sistemas individuais, com núcleos distintos, que, entretanto, possuem uma neuroanatomia consistente com interconexões e interações funcionais robustas, através de suas projeções para o prosencéfalo, formando uma rede complexa de inervações sobrepostas. Além disso, existem conexões entre os núcleos monoaminérgicos do prosencéfalo, propiciando uma coordenação entre suas atividades neuronais (Hamon e Blier, 2013; Hensler *et al.*, 2013).

Interações funcionais entre essas vias também já foram relatadas, com demonstrações do 5-HT exercendo uma influência negativa nos sistemas da NE e DA, através de mecanismos mediados pelos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, respectivamente. Além de influências complexas, positivas e negativas, do sistema da NE sobre neurotransmissão serotoninérgica, através dos receptores adrenérgicos α_1 e α_2 (Hamon e Blier, 2013).

Evidências sugerem que neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta, na área tegmental ventral, além de terminações dopaminérgicas, incluindo o núcleo accumbens, córtex pré-frontal medial, amígdala, corpo estriado e tubérculo olfatório, são inervados por células contendo 5-HT, que controlaria a atividade do sistema dopaminérgico, predominantemente de forma fásica e excitatória, excetuando-se pelo receptor 5-HT_{2C}, que parece ter uma ação tônica, e, como descrito anteriormente, inibitória (De Deurwaerdère e Di Giovanni, 2017).

1.6 Atividade Serotoninérgica na Epilepsia

Há evidências, baseadas em experimentos animais e estudos em humanos, envolvendo neuroimagem funcional, ensaios clínicos ou experimentos em tecido cortical, de que as vias serotoninérgicas desempenham um importante papel na epileptogênese.

1.6.1 Modelos Animais

Estudos com modelos animais são fundamentais para um maior conhecimento sobre as patologias humanas. Esses estudos têm contribuído significativamente para uma maior compreensão dos mecanismos de epileptogênese e de ação de fármacos antiepilépticos (Avanzini, 1995).

O modelo de ratos geneticamente propensos à epilepsia (GEPR) é um modelo animal de estudo da epilepsia, no qual a predisposição para crises é induzida através de estímulo sonoro. Além disso, eles também exibem limiares diminuídos para indução de crises epiléticas por uma variedade de outros métodos, incluindo hipertermia, eletrochoque, drogas convulsivas, e *kindling*. Observam-se duas linhagens com diferentes expressões de gravidade e manifestações: a linhagem GEPR-3, de gravidade moderada, na qual a resposta ao estímulo sonoro ocorre através de crises clônicas generalizadas; e a linhagem GEPR-9, com crises graves e que responde ao estímulo sonoro através de crises tônicas extensoras (Faingold, 1988; Dailey *et al.*, 1989; Jobe *et al.*, 1995). Esse modelo animal, possui uma depleção de 5-HT no sistema nervoso central que parece desempenhar um importante papel na

susceptibilidade às crises epiléticas (Jobe *et al.*, 1982; Jobe *et al.*, 1986; Dailey, Mishra, *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 2016). Foi demonstrado que a administração de medicações, que diminuem ainda mais estas concentrações, levam à maior gravidade das crises epiléticas (Jobe *et al.*, 1981; Mishra *et al.*, 1988).

Estudos em linhagens de GEPR evidenciaram um efeito anticonvulsivante dos fármacos inibidores seletivos de recaptação da 5-HT, com evidências sugerindo que esta ação está relacionada com mecanismos serotoninérgicos (Dailey, Yan, *et al.*, 1992; Yan *et al.*, 1994). Browning *et al.* (1997) demonstraram que o aumento extracelular de 5-HT observado após a administração concomitante do ISRS com um antagonista do receptor 5-HT_{1A} tem um papel importante para o efeito anticonvulsivante da fluoxetina. Além disso, um fator importante associado com o efeito anticonvulsivante da carbamazepina, em ambas as linhagens de GEPR, está associado com a liberação de 5-HT, com subsequente aumento de 5-HT extracelular, evidenciando uma relação da 5-HT na supressão de crises epiléticas (Yan *et al.*, 1992; Dailey *et al.*, 1997).

Outro importante modelo animal de ELT, o modelo da pilocarpina, também evidencia o papel das vias serotoninérgicas na epileptogênese. A pilocarpina é um potente agonista muscarínico, sendo que a sua administração sistêmica em ratos e camundongos promove uma série de alterações que reproduzem as características principais da ELT. O desenvolvimento do modelo ocorre em três fases distintas: na fase aguda observam-se crises límbicas que evoluem para estado de mal epilético (EME); uma fase silenciosa, onde ocorre normalização progressiva das alterações

comportamentais e eletroencefalográficas; e uma fase crônica, caracterizada por crises espontâneas recorrentes (Cavalheiro, 1995; Scorza *et al.*, 2009). Cavalheiro *et al.* (1994) demonstraram que na fase aguda ocorre um aumento dos níveis de 5-HT. Este achado foi corroborado por Lin *et al.* (2013), que além do aumento de 5-HT na fase aguda, observaram uma diminuição significativa destes níveis, comparado aos controles, na fase crônica. A depleção de 5-HT na fase crônica foi, posteriormente, corroborada por Kumar *et al.* (2016).

Ainda no modelo da pilocarpina, a depleção da 5-HT e as alterações de receptores serotoninérgicos esteve relacionada em diferentes estudos às variáveis clínicas. Trindade-Filho *et al.* (2008) avaliaram os efeitos da depleção de 5-HT, induzida por injeção de 5,7-dihidroxitriptamina. Estes autores observaram que após a administração desta substância, durante a fase aguda do desenvolvimento do modelo da pilocarpina, há uma maior facilitação da indução do EME. Quando a administração é realizada na fase crônica, ocorre um aumento significativo da frequência das crises espontâneas; sugerindo que a depleção da 5-HT está relacionada com uma piora da atividade epileptiforme.

Os estudos de Wang *et al.* (2015) e Yang *et al.* (2012) utilizaram modelos de epilepsia pela pilocarpina para avaliar as expressões dos receptores 5-HT₆ e 5-HT₇ respectivamente, através de técnicas imunológicas.

Wang *et al.* (2015), através da técnica de Western Blot, avaliou a expressão do receptor 5-HT₆ no hipocampo e neocórtex de ratos, modelos de epilepsia pela administração da pilocarpina, encontrando um aumento da expressão do receptor, em ambos os tecidos. O aumento foi evidenciado a partir do terceiro dia de administração da pilocarpina, se mantendo elevado até 30 dias após a administração, último momento que foi realizado o Western Blot.

Também observaram que os ratos que eram submetidos à administração de um antagonista seletivo do receptor 5-HT₆ (SB399885), previamente à administração da pilocarpina, evoluíam com uma maior latência de início das crises epiléticas e apresentavam uma menor gravidade das crises, com uma menor expressão do receptor 5-HT₆ e diminuição da atividade de *mammalian target of rapamycin* (mTOR).

Yang *et al.* (2012), através da técnica de imunohistoquímica, demonstraram um aumento da expressão do receptor 5-HT₇ no lobo temporal de ratos, modelos de epilepsia pela pilocarpina, comparados com grupos de ratos não epiléticos. Foi avaliado também a atividade eletroencefalográfica e comportamental dos ratos epiléticos, tratados com um antagonista seletivo do receptor 5-HT₇ (SB269970) ou com um agonista seletivo do receptor 5-HT₇ (AS19), encontrando que o agonista dos receptores 5-HT₇ poderia aumentar o número de crises epiléticas, as quais poderiam ser reduzidas pelo antagonista dos receptores 5-HT₇.

Yang *et al.* (2014) associaram o receptor 5-HT_{1A} com um efeito inibitório de EME em camundongos com epilepsia induzida pela pilocarpina e lítio. A administração subcutânea de um agonista do receptor 5-HT_{1A} nesses camundongos, antes da administração da pilocarpina, aumentou o tempo de latência da primeira descarga epileptiforme, do estado de mal eletrográfico e das manifestações da crise generalizada e, com doses mais elevadas, também foi observada uma diminuição da duração da crise generalizada. Sendo que todos esses efeitos foram inibidos pela administração combinada de um antagonista do receptor 5-HT_{1A}.

No estudo de Buchanan *et al.* (2014), camundongos com redução > 99% de neurônios serotoninérgicos no sistema nervoso central e camundongos controles foram induzidos à epilepsia pela pilocarpina ou por eletrochoque. O grupo com depleção dos neurônios serotoninérgicos apresentou um limiar epileptogênico menor e um aumento da mortalidade induzida por crises, quando comparado com controles. Além disso, a administração prévia de agonista do receptor 5-HT_{2A} foi relacionada com redução da taxa de mortalidade nos dois grupos. Estes achados sugerem que as vias serotoninérgicas têm um papel importante na regulação do limiar epileptogênico, na gravidade das crises epiléticas e na proteção à morte súbita na epilepsia.

Os camundongos DBA 1 e DBA 2 são modelos de morte súbita em epilepsia, geneticamente propensos a crises induzidas por estímulo auditivo. Esses camundongos desenvolvem uma insuficiência respiratória, levando à insuficiência cardíaca e morte súbita, provocada por crises generalizadas audiogênicas. Os modelos DBA diferem quanto à suscetibilidade à insuficiência respiratória. O modelo DBA 1 tem uma baixa susceptibilidade à insuficiência respiratória após 30 dias de estímulos auditivos iniciais. Entretanto, esta incidência pode chegar a aproximadamente 100% e durar meses, após 3 a 4 dias consecutivos de preparação (exposição ao estímulo). O modelo DBA 2 tem uma incidência de insuficiência respiratória de aproximadamente 75% após estímulos iniciais, diminuindo após 28 dias pós-natais. Ambos os modelos têm se mostrado relevantes no estudo da SUDEP (Feng e Faingold, 2017).

Existem evidências de que as vias serotoninérgicas estejam envolvidas na epileptogênese desse modelo animal. Estudos avaliando a expressão de receptores serotoninérgicos, através de Western Blot, no tronco encefálico de camundongos DBA, evidenciaram alterações nas expressões desses receptores. Nos camundongos DBA 1, as expressões dos receptores 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT3B estavam reduzidas e a do receptor 5-HT4 aumentada. Nos camundongos DBA/2, as expressões dos receptores 5-HT2C, 5-HT3C e 5-HT4 estavam reduzidas e do receptor 5-HT2C aumentada (Uteshev *et al.*, 2010; Faingold, Randall, *et al.*, 2011). Uteshev *et al.* (2010) sugeriram que uma das causas de susceptibilidade do modelo DBA/2 à insuficiência respiratória seria por uma expressão alterada dos receptores de 5-HT. A administração de fluoxetina, um inibidor seletivo de recaptação da 5-HT, previne a insuficiência respiratória sem bloquear as crises epiléticas, nos camundongos DBA (Faingold, Tupal, *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2015). Faingold *et al.* (2016) demonstraram que agonistas do receptor 5-HT3 bloqueiam o desenvolvimento de insuficiência respiratória em camundongos DBA 1 e que antagonistas do receptor 5-HT3, coadministrados com fluoxetina abolem o efeito de bloqueio da insuficiência respiratória pela fluoxetina.

Witkin *et al.* (2007) compararam o limiar de crises epiléticas induzidas por estímulo elétrico ou químico, pentilenotetrazol (antagonista do GABA) ou cocaína (inibidor de recaptação da noradrenalina, 5-HT e dopamina) entre ratos deficientes de receptor 5-HT7 e ratos selvagens. Ratos deficientes do receptor 5-HT7, exibem um limiar reduzido para crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol e por cocaína e para crises tônicas, mas não clônicas, induzidas por eletrochoque.

As injeções crônicas de metionina-sulfoximina (MSO), um inibidor da glutamina-sintetase, nos hipocampus de animais estão associadas com o desenvolvimento de um modelo animal de epilepsia-induzida caracterizado por crises espontâneas e recorrentes; em alguns casos com desenvolvimento de características semelhantes à esclerose hipocampal, com atrofia por perda neuronal hipocampal (Eid *et al.*, 2008). Foi demonstrado que após a administração de MSO em hipocampus de camundongos, os níveis de 5-HT sofrem uma redução significativa (Cloix, Tahi, Boissonnet, *et al.*, 2010; Picard *et al.*, 2011); a administração concomitante de 5-HT atrasa o início das crises induzidas por MSO (Picard *et al.*, 2011). Nesses camundongos, linhagens de latência curta de início de crises possuem níveis basais de 5-HT mais elevados que linhagens de latência longa, além disso, ambas as linhagens apresentam diminuições dos níveis de 5-HT após início das crises epiléticas (Cloix, Tahi, Boissonnet, *et al.*, 2010). Os autores propuseram que os camundongos de linhagens de latência curta conseguem metabolizar 5-HT na presença de MSO, ajudando assim a atrasar o início das crises, enquanto os camundongos de linhagens curtas são incapazes de metabolizar o 5-HT, justificando seus níveis mais elevados de 5-HT. Estes achados sugerem o envolvimento das vias serotoninérgicas com o desenvolvimento de crises epiléticas e a regulação de sua latência.

1.6.2 Estudos com Neuroimagem Funcional

Diversos estudos com PET-CT já evidenciaram uma redução significativa da afinidade de ligação dos receptores 5-HT_{1A} no lobo temporal ipsilateral à zona epileptogênica nos pacientes com ELT (Giovacchini *et al.*, 2005; Didelot *et al.*, 2008; Liew *et al.*, 2009; Assem-Hilger *et al.*, 2010).

Assem-Hilger *et al.* (2010), utilizando antagonista do receptor 5-HT_{1A}, [*carbonyl*-¹¹C]WAY-100635 ([¹¹C]WAY100635), realizaram PET-CT em 13 pacientes com epilepsia do lobo temporal e observaram que o potencial de ligação do receptor 5-HT_{1A} estava diminuído no hipocampo, giro para-hipocampal e amígdala do lobo epileptogênico de pacientes com ELT, quando comparados ao grupo controle. Além disso, observaram uma assimetria inter-hemisférica significativa nos pacientes com ELT.

Ito *et al.* (2007) realizaram um estudo semelhante ao anterior, utilizando PET-CT com [¹¹C]WAY100635 em 13 pacientes com ELT e observaram uma diminuição de ligação do receptor 5-HT_{1A} no lobo temporal, hipocampo e amígdala ipsilateral ao foco epileptogênico, mas também na amígdala contralateral.

Giovacchini *et al.* (2005) realizaram um estudo com PET-CT em 22 pacientes com ELT, utilizando outro antagonista do receptor 5-HT_{1A}, ¹⁸F-*trans*-4-fluoro-N-2-[4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]ethyl-N(2-pyridyl)cyclohexanecarboxamide (¹⁸F-FCWAY), e demonstraram que a redução do potencial de ligação do receptor 5-HT_{1A}, nos pacientes com ELT, se mantém nas estruturas mesio-temporais e ínsula, mesmo após a correção de

efeito parcial de volume, realizado para corrigir interferências da atrofia hipocampal nos resultados de PET-CT.

Merlet et al. (2004), através do estudo de PET-CT, com o antagonista do receptor 5-HT_{1A}, 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-(N-2"-pyridinyl)-p-[¹⁸F]fluorobenzamido]ethylpiperazine([¹⁸F]MPPF), associado com implantação de eletrodos intracerebrais e monitorização videoeletroencefalográfica das crises epiléticas, em nove pacientes com ELT, demonstraram que, além da redução da afinidade de ligação do receptor 5-HT_{1A} no lobo temporal epileptogênico, quando comparado à pacientes controle, esta redução de ligação do receptor 5-HT_{1A} estava relacionada com o grau de epileptogenicidade das áreas corticais.

Liew et al. (2009) realizaram estudo de PET-CT com ¹⁸F-FCWAY em 12 pacientes com ELT, sem alterações compatíveis na RM. Foi evidenciado que a relação entre a diminuição do potencial de ligação do receptor 5-HT_{1A} coincide com a região da atividade epileptiforme, demonstrada através da combinação de eletroencefalografia com eletrodos de superfície e eletrodos subdurais ou intra-operatórios, mesmo nesses pacientes sem lesões temporais identificadas pela ressonância magnética encefálica.

O estudo de Didelot et al. (2008), utilizou PET-CT com o antagonista do receptor 5-HT_{1A}, 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-(N-2-pirydynyl)-p-fluorobenzamido]-ethyl-piperazine (MPPF), em 42 pacientes com ELT, sendo 32 pacientes com ELT mesial. Ao combinar os resultados da PET-CT com dados e resultados pós--cirúrgicos, foi observado que todos os pacientes com ELT, que apresentaram uma diminuição do potencial de ligação ao antagonista do receptor 5-HT_{1A} no hipocampo, amígdala e polo temporal,

simultaneamente, foram bons candidatos cirúrgicos, evoluindo com resolução das crises após lobectomia temporal anterior.

1.6.3 Ensaios Clínicos

Diversos estudos experimentais com modelos animais evidenciaram o papel anticonvulsivante dos ISRS. Além disso, alguns ensaios clínicos obtiveram resultados semelhantes em humanos. Um ensaio clínico com 17 pacientes com crises focais, com ou sem crises generalizadas associadas, avaliou o efeito da fluoxetina na frequência das crises epiléticas. Em seis pacientes, houve remissão completa das crises epiléticas após 8 meses de tratamento. Nos onze pacientes restantes, houve uma redução de aproximadamente 30% na frequência das crises epiléticas (Favale *et al.*, 1995). Em um ensaio preliminar com onze pacientes com epilepsia farmacorresistente, sem depressão associada, foi administrado citalopram por um período de 8 a 10 meses. Houve uma redução da média de frequência das crises epiléticas em 55,6%, com nove pacientes melhorando pelo menos 50% (Favale *et al.*, 2003).

Semelhantemente a esses estudos, um recente estudo observacional retrospectivo em 100 pacientes com epilepsia, que iniciaram ISRS ou inibidores de recaptação da serotonina e norepinefrina (IRSN) para tratamento de depressão ou ansiedade, observou que estas drogas poderiam estar relacionadas com uma redução na frequência das crises epiléticas (Ribot *et al.*, 2017)c.

1.6.4 Estudos em Tecido Humano

Poucos estudos foram realizados com tecido cerebral humano, correlacionando as vias serotoninérgicas com a epilepsia. Estes dados são ainda mais escassos quando analisamos somente o hipocampo (Broderick *et al.*, 2000).

A concentração de 5-HT foi avaliada previamente no tecido cerebral humano de pacientes com ELT (Mori *et al.*, 1987; Pintor *et al.*, 1990; Naffah-Mazzacoratti *et al.*, 1996; Broderick *et al.*, 2000; Pacia *et al.*, 2001), incluindo pesquisa através da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Mori *et al.*, 1987; Pintor *et al.*, 1990; Naffah-Mazzacoratti *et al.*, 1996), como será detalhado a seguir.

Naffah-Mazzacoratti *et al.* (1996) avaliaram os níveis de monoaminas, através da HPLC com detecção eletroquímica, no líquido e no tecido temporal de seis pacientes com crises focais fármacorresistente, submetidos ao tratamento cirúrgico para controle das crises epiléticas, que foram monitorados com eletrocorticografia durante o procedimento cirúrgico. Os níveis de 5-HT e seu metabólito, o ácido 5-hidróxi-indol-acético, estavam aumentados nas áreas temporais de maior atividade epileptogênica, quando comparado com áreas não epileptogênicas. Pintor *et al.* (1990), através de HPLC com detecção eletroquímica, acharam resultados semelhantes no tecido temporal neocortical de 20 pacientes com epilepsia farmacorresistente.

Mori *et al.* (1987) analisaram os níveis de monoaminas, através de HPLC com detecção eletroquímica, no tecido cerebral de 12 pacientes com

epilepsia fármacorresistente. Não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de 5-HT dos pacientes com epilepsia e os pacientes controle. Entretanto, neste estudo, a etiologia da epilepsia dos pacientes analisados era predominantemente pós-traumática ou tumoral, com um caso de ELT geneticamente determinada.

Broderick *et al.* (2000) realizaram um estudo de monoaminas em camadas do hipocampo através da microvoltametria, proveniente de 13 pacientes com ELT farmacorresistente, nove pacientes com ELT mesial e quatro com ELT neocortical. O 5-HT foi achado em todas as camadas estudadas do hipocampo, com maior concentração nas células granulares do giro denteado e na camada piramidal do hipocampo dos pacientes com ELT neocortical, quando comparado ao tecido proveniente de pacientes com ELT mesial.

Trottier *et al.* (1996) avaliaram a inervação serotoninérgica, através de imunoquímica, no tecido cortical de quatro pacientes com epilepsia focal de etiologia indeterminada e causada por displasia, submetidos a avaliação eletroencefalográfica com eletrodos profundos seguido de procedimento cirúrgico. Foi evidenciado uma maior inervação serotoninérgica no tecido cortical dos pacientes com epilepsia por displasia, mas não nos de etiologia indeterminada, quando comparados com controles.

Os receptores serotoninérgicos e o 5-HTT foram avaliados no tecido pós-operatório de pacientes com ELT. Palomero-Gallagher *et al.* (2012) e Graebenitz *et al.* (2011) avaliaram a densidade de receptores, através de autorradiografia, nas biópsias de pacientes com ELT fármacorresistente, comparado com autópsias de controles. O primeiro estudo, realizado na

amostra neocortical de 36 pacientes com epilepsia focal fármacorresistente, encontrou uma maior densidade do receptor 5-HT_{1A} nos tecidos epiléticos neocortical, comparado aos controles e nenhuma alteração nos receptores 5-HT_{2A}. O segundo estudo, realizado em amostra de amígdala de 26 pacientes com ELT fármacorresistente, encontrou uma diminuição da densidade do receptor 5-HT_{1A}, quando comparado ao controle.

Nos estudos de Wang *et al.* (2015) e Yang *et al.* (2012), descritos previamente, em modelos de pilocarpina, também foram avaliados a densidade dos receptores 5-HT₆ e 5-HT₇, respectivamente, em tecidos corticais humanos. Wang *et al.* (2015), através da técnica de Western Blot, encontrou uma maior expressão do receptor 5-HT₆ no neocórtex temporal de 25 pacientes operados por epilepsia temporal lateral fármacorresistente, comparado com pacientes controles, operados por hipertensão intracraniana pós-traumática. Yang *et al.* (2012) demonstrou, através de imunohistoquímica, que a expressão de receptores 5-HT₇ no córtex temporal anterior de 28 pacientes operados por epilepsia farmacorresistente era maior do que nos do córtex dos pacientes controles, operados por hipertensão intracraniana pós-traumática. Ambos os estudos encontraram aumento da expressão de receptores serotoninérgicos, tanto em modelo animal, quanto em tecido humano, quando comparados com controles, sugerindo que esses receptores podem estar associados com uma modulação da atividade epilética e/ou patogênese da epilepsia.

O estudo de Rocha *et al.* (2007) avaliou a afinidade de ligação serotoninérgica, avaliando a 5-HT, receptores e transportador serotoninérgico, através da técnica de autorradiografia, em tecido temporal neocortical de 15

pacientes com ELT mesial, quando comparados com controles de tecido de vítimas fatais de acidente de automobilístico ou de câncer de pulmão, sem acometimento neurológico. No estudo, foi demonstrado uma diminuição da afinidade de ligação do 5-HTT em todas as camadas corticais dos pacientes com ELT mesial. Além de uma associação entre as alterações de receptores 5-HT7 e 5-HT4 com a idade de início da epilepsia, a duração da epilepsia e o uso de FAEs. Uma menor afinidade de ligação do receptor 5-HT7 foi encontrada em todas as camadas de pacientes com idade precoce de início da epilepsia e, em algumas camadas (III-IV, V-VI), de pacientes com maior duração da epilepsia ou uso prolongado de FAEs. Já a afinidade de ligação do receptor 5-HT4 foi encontrada diminuída em algumas camadas (III - IV) de pacientes com maior duração da epilepsia ou do uso prolongado de FAEs ou aumentada em outras camadas (V - VI) nos pacientes com uso prolongado de FAEs.

Cuellar-Herrera *et al.* (2014) avaliaram a ativação funcional dos receptores 5-HT1A acoplados à proteína G, através de um ensaio de ligação, utilizando 8-OH-DPAT (um antagonista do receptor 5-HT1A), no tecido hipocampal de 8 pacientes com ELT mesial fármacorresistente, comparados com tecido hipocampal controle proveniente de autópsias de indivíduos sem relato de condições neurológicas. Foi observado uma maior ativação desses receptores, nos pacientes com ELT mesial.

1.7 Atividade Serotoninérgica nos Transtornos Psiquiátricos nos Pacientes com Epilepsia

Diversos estudos clínicos e experimentais já demonstraram que na depressão ocorre um aumento na regulação dos receptores 5-HT_{1A} localizados na rafe, com consequente auto-inibição aumentada da liberação de 5-HT. Este mecanismo também pode estar envolvido nos pacientes com depressão associado à epilepsia.

Em um estudo com PET-CT, realizado nos pacientes com ELT e depressão, foi demonstrado que a afinidade de ligação dos receptores 5-HT da rafe estava aumentada e positivamente relacionada com a gravidade dos sintomas depressivos (Lothe *et al.*, 2008). Outros estudos em humanos, com neuroimagem funcional, tendo como alvo os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, sugerem um papel fisiopatológico comum da 5-HT na depressão e epilepsia (Hasler *et al.*, 2007). Nos dois estudos, foi demonstrada uma diminuição da ligação de 5-HT em estruturas comuns das duas patologias: nas regiões temporais mesiais, giro do cíngulo e núcleo da rafe (Hasler *et al.*, 2007; Lothe *et al.*, 2008).

Martinez *et al.* (2013) demonstraram uma assimetria de afinidade de ligação do 5-HTT na ínsula e no giro fusiforme, entre os lados ipsilateral e contralateral à zona epileptogênica, nos pacientes com ELT e depressão associada, quando comparados com pacientes com ELT isolada, sugerindo uma diminuição da atividade do 5-HTT nestes pacientes, compensatória a uma perda do receptor 5-HT_{1A}, que também estava alterado neste estudo.

Usando modelos animais de estado de mal induzido por lítio e pilocarpina (modelo animal de epilepsia temporal), Mazarati *et al.* (2008) encontraram sintomas de depressão nos ratos pós EME. Este estudo demonstrou uma transmissão interictal serotoninérgica rafe-hipocampal

diminuída nos ratos pós EME induzido. Estudos posteriores evidenciaram que a depressão associada com a epilepsia é acompanhada por hipersensibilização dos receptores 5-HT_{1A}, em ratos pós EME induzido, quando comparados aos controles saudáveis (Pineda *et al.*, 2010; Pineda *et al.*, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Há evidências provenientes de estudos animais e de neuroimagem funcional associando as vias serotoninérgicas com a epileptogênese. Além disto, sugere-se que estas vias poderiam estar envolvidas nos mecanismos fisiopatológicos comuns da epilepsia e dos transtornos psiquiátricos. Entretanto, estudos em tecido cerebral humano são escassos, principalmente em grupos com etiologia homogênea, e diferem muito da região cerebral utilizada.

Dentre esses estudos, os que mensuram a concentração de 5-HT utilizaram amostras pequenas de pacientes com etiologia heterogênea e não avaliaram variáveis clínicas da epilepsia, bem como a presença dos transtornos psiquiátricos. Aqueles que abordaram os receptores serotoninérgicos e o transportador serotoninérgico (5-HTT) utilizaram pacientes com ELT determinada por diferentes etiologias, ou seja, grupos heterogêneos etiologicamente. Além disso, diferentes regiões cerebrais foram avaliadas, sendo que poucos abordaram as variáveis clínicas e nenhum avaliando as comorbidades psiquiátricas.

A ELT, protótipo das epilepsias cirurgicamente tratáveis e frequentemente reproduzida nos modelos animais para estudo, tem como principal causa a EH, sendo este um excelente modelo para estudo em humanos, permitindo uma seleção etiologicamente mais homogênea dos pacientes. Além disto, sendo o hipocampo o local acometido nesta patologia, é muito importante a avaliação das possíveis alterações neurobiológicas desta região.

Este é o primeiro estudo avaliando as vias serotoninérgicas em tecido hipocampal humano de pacientes homogêneos quanto à etiologia, ou seja,

com ELT-EH. Além disso, é o primeiro que correlaciona a concentração de 5-HT e a densidade dos receptores serotoninérgicos e do 5-HTT com as variáveis clínicas da epilepsia dentro deste grupo, bem como, compararam, nestes pacientes, a presença ou ausência de transtornos psiquiátricos associados. Espera-se que os presentes achados possam contribuir para melhor delimitar os mecanismos serotoninérgicos que podem ser responsáveis pela gravidade da epilepsia, assim como, dos mecanismos envolvendo a correlação entre epilepsia e comorbidades psiquiátricas.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo primário avaliar se existe associação entre a concentração de 5-HT ou a densidade dos receptores serotoninérgicos e do 5-HTT, avaliados no hipocampo de pacientes com ELT-EH, com fatores associados com a gravidade da epilepsia. O objetivo secundário é o de avaliar se existe relação entre a atividade serotoninérgica no tecido hipocampal dos pacientes com ELT-EH e a presença de transtornos psiquiátricos

3.2 Objetivos Específicos

Este estudo tem como objetivos específicos:

1. Avaliar a concentração de 5-HT através da técnica de HPLC.
2. Avaliar a densidade de receptores de 5-HT no hipocampo, através da técnica de Western-Blot.
3. Avaliar a densidade do 5-HTT no hipocampo, através da técnica de Western-Blot.
4. Analisar se as concentrações de 5-HT, assim como a densidade dos receptores serotoninérgicos e do 5-HTT estão associadas com variáveis clínicas da epilepsia.
5. Verificar se as concentrações de 5-HT, assim como a densidade dos receptores serotoninérgicos e do 5-HTT estão associadas com a presença de transtorno psiquiátrico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

4.1.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos os pacientes submetidos a procedimento neurocirúrgico caracterizado por lobectomia temporal anterior, por indicação clínica, que preenchem os seguintes critérios:

- Investigação e diagnóstico prévio de ELT-EH unilateral e fármacorresistente, com indicação de tratamento cirúrgico.
- Diagnóstico de epilepsia baseado na proposta mais atual da *ILAE* (Fisher *et al.*, 2014) e a epilepsia considerada farmacorresistente na ausência de controle das crises epilépticas, isto é, uma ou mais crises por mês, após tratamento com dois ou mais FAEs adequadamente escolhidos e nas doses máximas toleradas (Beleza, 2009; Kwan e Sperling, 2009; Kwan *et al.*, 2010).
- A avaliação prévia com ressonância magnética demonstrando diminuição do volume hipocampal nas imagens ponderadas em T1 e aumento do hipersinal em T2 e *flair* foi critério absoluto (Camacho e Castillo, 2007; Menzler *et al.*, 2010; Blümcke *et al.*, 2013).
- Pacientes nos quais a amostra de tecido hipocampal dissecada foi armazenada a -80°C, logo após procedimento cirúrgico, até homogeneização.

As comorbidades psiquiátricas foram avaliadas através da Entrevista Clínica Estruturada para Transtornos de Eixo I do DSM-IV - SCID-4 (*Structured Clinical Interview for DSM-IV AXIS Disorders*).

Durante a análise dos dados foram divididos grupos em monoterapia e politerapia para avaliação quanto a possíveis interferências nos resultados.

4.1.2 Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão foram: 1. Não consentimento na pesquisa após a apresentação do termo de consentimento livre e esclarecido (**ANEXO 1**) ou ao termo de assentimento (para crianças ou adolescentes); 2. Pacientes na qual a amostra de tecido humano, após o procedimento cirúrgico, não era suficiente para análise

4.1.3 Caracterização dos Pacientes

O tecido hipocampal avaliado foi proveniente de uma amostra constituída por 44 pacientes, sendo 24/44 (54.5%) do sexo feminino, com idade média de início da epilepsia de 8,9 anos (DP $\pm 7,4$) e duração média da epilepsia de 26 anos (DP $\pm 12,0$). História de CTCG estava presente em 65.9% dos pacientes (29/44); história de EME em 13.6% (6/44), história de crises febris em 20.5% (9/44) (**Gráfico 1**).

Transtornos psiquiátricos foram diagnosticados em 54.5% (24/44) dos pacientes, incluindo os seguintes diagnósticos: transtorno depressivo em 34.0% (15/44), transtorno de ansiedade em 2.2% (1/44) e psicose em 18.2% (8/44) (**Gráfico 1**).

Todos os pacientes estavam em uso de FAEs no momento da cirurgia, como monoterapia ou politerapia. Com exceção de um paciente em monoterapia com fenitoína, todos os outros pacientes em monoterapia estava em uso de carbamazepina ou oxcarbazepina. Os FAEs utilizados em associação foram topiramato, fenobarbital, ácido valpróico e benzodiazepínicos (**Tabela 1**).

Tabela 1- Caracterização dos pacientes

Paciente	Sexo	Idade na cirurgia (anos)	Idade início epilepsia (anos)	Duração da epilepsia (anos)	Frequência das crises	História de crises febris	História de CTCG	Frequência CTCG	História de EME	FAEs	ISRS/Antipsicóticos	TP
1	Fe	13	5	7	S	+	+	E	-	OXC/BZD	-	De
2	Fe	19	0.9	18	D	-	+	Me	-	CBZ/PB/BZD	-	De
3	Fe	47	6	41	Me	+	+	Me	-	OXC/BZD	-	De
4	Fe	40	5	35	Me	-	+	E	-	LMT/TPM/PB	-	De
5	Fe	35	12	23	Me	-	+	E	-	CBZ/LMT/PB	-	De
6	Fe	39	9	30	Me	-	+	E	-	CBZ/PHT	-	De
7	M	29	16	13	S	+	+	E	-	CBZ/VPA/PB/BZD	SER/RISP	De
8	Fe	41	3	38	S	-	+	E	+	PHT/PB	SER/HAL	De
9	Fe	45	10	35	S	-	+	E	-	OXC/PB	-	A
10	M	37	20	17	Me	-	+	E	-	CBZ	-	P
11	M	27	5	22	Me	+	+	E	-	VPA/PB	-	P
12	Fe	43	8	35	Me	-	+	E	-	CBZ/PB	HAL	P
13	Fe	41	18	23	D	-	+	Me	-	PHT/BZD	-	P
14	Fe	45	1	44	Me	-	+	E	-	PHT/LMT/BZD	RISP	P
15	M	44	21	23	S	-	+	E	-	CBZ/BZD	RISP	P
16	Fe	53	1	52	Me	-	+	E	-	PHT/PB	HAL	P
17	M	35	9	26	D	-	+	E	-	CBZ/BZD	-	P
18	M	22	1	21	S	-	+	E	+	CBZ/PB/BZD	-	N
19	M	24	4	20	D	-	+	E	+	CBZ/BZD	-	N
20	M	10	0.75	10	S	-	+	Me	-	CBZ	RISP	N
21	Fe	44	29	15	Me	-	+	Me	-	CBZ	-	N
22	M	24	0.4	24	Me	-	+	Me	+	CBZ	-	N
23	M	52	24	28	D	-	+	Me	+	CBZ	-	N
24	Fe	51	8	43	S	+	+	E	-	PHT/TPM/PB/BZD	-	N
25	Fe	38	0.75	37	Me	+	+	Me	-	CBZ/BZD	-	N

Tabela 1- Caracterização dos pacientes (continuação)

Paciente	Sexo	Idade na cirurgia (anos)	Idade início epilepsia (anos)	Duração da epilepsia (anos)	Frequência das crises	História de crises febris	História de CTCG	Frequência CTCG	História de EME	FAEs	ISRS/Antipsicóticos	TP
26	M	28	3	25	S	-	+	Me	-	CBZ/PB	-	N
27	M	42	1	41	Me	-	+	E	+	OXC/LMT/BZD	-	N
28	M	47	12	35	Me	-	+	Me	-	CBZ/PB	-	N
29	Fe	33	21	12	S	-	+	E	-	CBZ/BZD	-	N
30	Fe	41	14	27	S	-	-	-	-	PHT/TPM/PB	SER	De
31	M	15	3	12	S	+	-	-	-	CBZ	SER	De
32	Fe	34	11	23	S	-	-	-	-	CBZ/VPA	SER	De
33	Fe	43	12	29	Me	+	-	-	-	CBZ/PB/BZD	SER	De
34	Fe	37	21	16	Me	-	-	-	-	CBZ/BZD	FLX	De
35	Fe	41	14	27	S	-	-	-	-	CBZ/LMT/BZD	FLX	De
36	M	17	1	16	Me	-	-	-	-	CBZ/TPM/BZD	SER/RISP/HAL	De
37	Fe	69	9	60	Me	-	-	-	-	CBZ/PB	-	N
38	Fe	20	3	17	S	-	-	-	-	CBZ	-	N
39	Fe	13	5	8	Me	-	-	-	-	CBZ	-	N
40	M	46	12	34	S	+	-	-	-	PXC/PB	-	N
41	M	20	10	10	S	-	-	-	-	CBZ/PB	-	N
42	M	29	5	24	Me	-	-	-	-	CBZ/VPA/BZD	-	N
43	M	50	16	34	Me	-	-	-	-	CBZ/LMT/PB/PHT	-	N
44	M	18	1	17	Me	-	-	-	-	CBZ	-	N

CTCG: crise tônico-clônico generalizada; EME: estado de mal epilético; TP: transtorno psiquiátrico; Fe: feminino; M: masculino; D: diário; S: Semanal; Me: mensal; E: esporádico; De: depressão; A: ansiedade; P: psicose; N: nenhum; BZD: benzodiazepínico; CBZ: carbamazepina; LTG: lamotrigina; OXC: oxcarbazepina; PB: fenobarbital; PHT: fenitoína; TPM: topiramato; VPA: ácido valpróico; FLX: fluoxetina; HAL: haloperidol; SER: sertralina; RISP: risperidona

Gráfico 1- Caracterização dos pacientes

EME: estado de mal epiléptico; CTCG: crises tônico-clônico generalizadas; TP: transtorno psiquiátrico

4.2 Cromatografia Líquida de Alta Pressão

4.2.1 Preparação do Hipocampo

O tecido cerebral humano dissecado e armazenado, foi homogeneizado com ácido perclórico 3,4M em potter (Potter S, B. Braun da Biotech International®) para uma concentração final de 25mg/ml. Em seguida, sonificado por 30 segundos para lise de membranas (Biotech International®, VirSonic 100 da Virtis®), centrifugado 14000g a 4°C por 20 minutos (Centrífuga Himac CF ISC2 da Hitachi ®) e armazenado a -80° C até uso.

4.2.2 Técnica de Análise

A metodologia de quantificação de 5-HT através da cromatografia líquida de alta pressão foi desenvolvida baseada em protocolos previamente estabelecidos pelo grupo em plaquetas humanas e em estudos prévios da literatura (Baumann *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 1999; Noguchi *et al.*, 2000; Umeda *et al.*, 2005; Talib *et al.*, 2011).

A 5-HT foi diluída em uma solução de fosfato de sódio da Merck (Darmstadt, Germany). O dodecil sulfato de sódio utilizado foi da Aldrich-Sigma (Steinheim, Germany). Ácido Perclórico (HClO₄), metanol e acetonitrila foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany).

A fase móvel foi composta por uma mistura de solução ácida (contendo fosfato de sódio 0,1 M e dodecil fosfato de sódio 10µM), acetonitrila e metanol (70:15:15 v/v/v) A fase móvel foi ajustada para pH 2.5 com ácido perclórico 37%, filtrada com filtro de 0.45-mm e degaseificada antes do uso. A fase móvel foi usada em temperatura ambiente com fluxo de 0,8 ml/min (pressão aproximada de 150 bar).

Foram preparados padrões com solução de fosfato de sódio, que armazenados em frascos âmbar nas seguintes concentrações: 1mg/mL, 0,1mg/mL, 0,01mg/mL, 0,001mg/ml e 0.0001mg/ml de 5-HT. O padrão externo foi o 5- metoxitriptamina preparado em uma solução de fosfato de sódio 30mM, pH 7,4 e armazenado em frasco âmbar a 4°C.

A cromatografia foi realizada pelo sistema Shimadzu. A coluna (250 x 4.0 mm i.d.) utilizada foi a Lichrospher 5 mm 100 C8 (Varian) e a detecção realizada por fluorescência (Shimadzu), ideal para compostos que fluorescem

devido a sua alta sensibilidade, ajustada em 330 nm para excitação e 450nm para emissão.

Para a curva de calibração foi utilizado 200µL de ácido perclórico, também utilizado para homogeneizar o tecido cerebral humano e, o qual é livre de substâncias potencialmente interferentes no comportamento da 5-HT. As soluções padrões foram preparadas semanalmente.

4.3 Western Blot

4.3.1 Preparação do Hipocampo

O tecido hipocampal foi dissecado e armazenado -80°C, sendo posteriormente homogeneizado no tampão de lise (RIPA buffer) com inibidores de fosfatase e protease, para uma concentração final de 200 mg/ml. As alíquotas homogeneizadas foram armazenadas a -80°C.

4.3.2 Técnica de Análise

Os níveis de proteína total foram determinados utilizando o kit de dosagem de proteína *DC (detergent compatible) Protein Assay* (Bio-Rad, Life Sciences Group, Hercules, California, USA) e o método espectrofotométrico utilizado para esta quantificação foi o de Lowry modificado (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1977).

Para fracionar 25 mg de proteína de cada amostra, foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%. O marcador de peso molecular utilizado foi da Bio-Rad. A corrida da eletroforese foi de 160V por 90 minutos.

Após a corrida, foi realizado a fase de transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose. Foi realizada uma transferência eletroforética, com 250mA, por 60 minutos.

Após a transferência, foi utilizado o corante *Ponceau* para confirmar a transferência das proteínas para a membrana (**Figura 1**).

Figura 1- Membrana de nitrocelulose após utilização do Ponceau

Antes da detecção da proteína de interesse, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em solução salina tamponada com Tris (TBS), acrescida de polissorbato 20 ou tween 20 (T) a 0,02%, com o objetivo de impedir ligações inespecíficas nas membranas. As membranas que seriam reagidas com os receptores 5-HT1A, 5-HT2A e 5-HT6 permaneceram em bloqueio com leite durante 1 hora em temperatura ambiente. As membranas que seriam reagidas com o receptor 5-HT7 e o 5-HTT permaneceram em bloqueio com leite durante uma noite à uma temperatura de 4°C.

Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com solução de TBS-T 0,02% e então incubadas com anticorpo monoclonal primário: Os anticorpos

dos receptores 5-HT1A (anticorpo policlonal de coelho anti 5-HT1A, ab64994, Abcam, Cambridge, MA, USA); 5-HT2A (anticorpo policlonal de coelho anti 5-HT2A, ab85496, Abcam, Cambridge, MA, USA) e 5-HT6 (anticorpo policlonal de coelho anti 5-HT6, ab101911, Abcam, Cambridge, MA, USA) foram diluídos em solução de TBS-T 0.02%, com uma proporção de 1:1000 e incubados durante a noite, em temperatura de 4° C.

Os anticorpos do receptor 5-HT7 (anticorpo policlonal de coelho anti 5-HT7, ab28892, Abcam, Cambridge, MA, USA) e do 5-HTT (anticorpo policlonal de coelho anti 5-HTT, ab102408, Abcam, Cambridge, MA, USA) foram diluídos em solução de TBS-T 0.02%, com uma proporção de 1:3000 e 1:1000, respectivamente, e incubados por 1 hora, em temperatura ambiente.

As membranas foram lavadas com TBS-T 0,02% e, então, incubadas com anticorpo secundário (anticorpo secundário anti-coelho da Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), por 1 hora, em temperatura ambiente. A diluição do anticorpo secundário em TBS-T 0.02% foi de 1:20000 nas membranas de receptores 5-HT1A, 5-HT7 e 5-HTT; e de 1: 10000 nas membranas dos receptores 5-HT2A e 5-HT6.

As membranas foram novamente lavadas com TBS-T 0.02% e levadas para revelação. Para este processo, foi utilizado um reagente quimioluminescente (*Enhanced chemiluminescence ECL Select; GE Life Sciences, Marlborough, MA, USA*), que foi aplicado nas membranas. As membranas foram imediatamente inseridas no aparelho detector (Chemilmager 4000 systems). Neste aparelho, a luz é capturada, fotografada e convertida em uma imagem digital. A análise da densitometria das diferentes bandas protéicas foi realizada através do software v5.5 da Alpha Innotech (San

Leandro, CA, USA). Cada amostra foi analisada em duplicata. Como o método é semi-quantitativo, foram comparadas as intensidades de densidade entre as diferentes amostras (**Figura 2**).

Figura 2- Amostra de membrana incubada com 5-HTT

4.4 Análise Estatística

Foram analisadas as seguintes variáveis: idade de início da epilepsia, duração da epilepsia, presença de crises febris, presença de EME, presença e frequência de crises epiléticas, presença e frequência das CTCG, FAEs (monoterapia versus politerapia). Também foram avaliados o uso de ISRS e de drogas antipsicóticas e a presença e tipo de transtorno psiquiátrico.

O desfecho primário foi identificar a associação entre variáveis clínicas da epilepsia e concentração de 5-HT ou densidade dos receptores serotoninérgicos e do 5-HTT. O resultado clínico secundário foi a presença de transtorno psiquiátrico.

Primeira análise: A relação entre a concentração de 5-HT, a densidade dos receptores serotoninérgicos ou do 5-HTT e as variáveis clínicas

foram acessadas com os seguintes testes: 1. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ou teste de Kruskal-Wallis para variáveis independentes, dependendo do número de grupos ou teste de Jonckheere-Terpstra para variáveis independentes ordinais e 2. Coeficiente de correlação de Spearman para variáveis contínuas e ordinais.

A associação entre crises TCG e as variáveis confusionais foi analisada pelo teste exato de Fischer.

Segunda análise: Para acomodar fatores confusionais, a associação entre a concentração de 5-HT, a densidade dos receptores serotoninérgicos ou a densidade do 5-HTT com variáveis independentes foi acessada com o modelo linear de distribuição gama. Para a distribuição normal, foi avaliado através do gráfico quantil quantil.

As análises estatísticas foram realizadas com o programa *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 4.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Todos os testes foram bicaudais e, em todos eles, foi adotado um nível de significância estatística de 5%.

4.5 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP e enquadrado como APROVADO, sob o número CAAE: 56797513.4.0000.0068; número do parecer 1.633.093.

5. RESULTADO

5.1 Concentração de Serotonina

Os resultados sobre a concentração de 5-HT que serão apresentados abaixo, encontram-se no artigo Fonseca, NC *et al. Epilepsy Research* 2015; 111:18-25. (ANEXO 2)

A determinação da concentração de 5-HT foi realizada em 44 amostras de hipocampo, sendo que os níveis variaram entre 0.0916 a 0.7323 ng/mg, com uma média de concentração de 0.3366 ng/mg (**Gráfico 2**). Níveis séricos mais baixos de 5-HT foram associados com presença de crises TCG (Wilcoxon—Mann—Whitney; $p = 0.019$). (**Tabela 2, Figura 3, Gráfico 3**).

Gráfico 2- Níveis de dispersão da concentração de serotonina

Tabela 2- Média de 5-HT nos pacientes com e sem história de CTCG.

História de CTCG	N	Média 5-HT	Desvio Padrão
Ausente	20	0.4084	0.16127
Presente	16	0.2995	0.16359
Total	44	0.3366	0.16919

Figura 3 - Cromatograma de paciente com e sem história de CTGC. Acima: paciente com história de CTGC. Abaixo: paciente sem história de CTGC. Pico de 5-HT em 5,4 minutos e pico de padrão externo de 7,6 minutos. Concentração de 5-HT (área preenchida em verde) no primeiro de 0,173 ng/mg e, no segundo, de 0,256 ng/mg.

Gráfico 3 - Concentração de 5-HT entre pacientes com e sem história de CTGC.

Não houve diferenças significativas entre os níveis de 5-HT e outras variáveis clínicas.

No subgrupo de pacientes com crises TCG, não houve diferenças significativas entre pacientes em politerapia ou monoterapia (teste exato de Fisher; $p = 0.464$); também não houve diferenças significativas com o uso de antipsicóticos (teste exato de Fisher; $p = 0.226$), com histórico de crises febris (teste exato de Fisher; $p = 1.000$) ou de EME (teste exato de Fisher; $p = 0.134$). Transtornos psiquiátricos estiveram igualmente distribuídos entre os pacientes com e sem crises TCG (teste exato de Fisher; $p = 0.532$). Os pacientes usando ISRS apresentaram menos crises TCG (teste exato de Fisher; $p = 0.004$).

Para analisar se as crises TCG e os ISRS interferiam na concentração de 5-HT simultaneamente, foi utilizado o Modelo Linear Generalizado (GLM) com distribuição gama, com fator de interação. O resultado foi significativo indicando que no grupo de pacientes com crises TCG, o uso de ISRS altera significativamente a concentração de 5-HT ($p = 0.011$).

Os níveis de 5-HT não foram correlacionados com outras variáveis clínicas, incluindo a idade de início da epilepsia (coeficiente de Correlação de Spearman; $p = 0.938$), a duração da epilepsia (coeficiente de correlação de Spearman; $p = 0.745$), a frequência de crises epiléticas (Kruskal—Wallis; $p = 0.211$), o histórico de EME (Wilcoxon—Mann—Whitney; $p = 0.657$) e o histórico de crises febris (Wilcoxon—Mann—Whitney; $p = 0.250$). Não houve diferenças significativas com a presença ou tipo de transtorno psiquiátrico (Wilcoxon—Mann—Whitney; $p = 0.334$), assim como entre os pacientes com monoterapia e politerapia (Wilcoxon—Mann—Whitney; $p = 0.302$).

5.2 Densidade Receptores Serotoninérgicos

- Receptor 5-HT1A

Os resultados sobre a densidade do receptor 5-HT1A que serão apresentados abaixo, encontram-se no artigo Fonseca, NC *et al. European Journal of Neurology* 2017; 24(4):602 – 608 (ANEXO 3).

A análise da densidade dos receptores 5-HT1A foi realizada em 34 amostras de tecido hipocampal. As características demográficas e clínicas desses pacientes encontra-se no **ANEXO 4**.

Foi encontrada uma associação entre a maior densidade do receptor 5-HT1A e maior duração da epilepsia (coeficiente de correlação de Spearman: $p = 0.040$) (**Gráfico 4; Figura 4**); sendo que cada ano de epilepsia aumentou a densidade do receptor 5-HT1A em 2.1% (GLM: $p = 0.026$). Além disso, o uso de antipsicóticos interferiu na densidade do receptor 5-HT1A (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.028$), diminuindo em 55.9% o seu nível de densidade (GLM: $p = 0.003$) (**Tabela 3**).

Paciente 1

Duração epilepsia: 60 anos

Densidade: 329.238

Paciente 2

Duração epilepsia: 37 anos

Densidade: 130.221

Figura 4 - Amostras de membranas incubadas com anticorpo anti-receptor 5-HT1A, comparando paciente com diferentes durações de epilepsia

Gráfico 4 - Gráfico de dispersão entre o receptor 5-HT1A e a duração da epilepsia

Tabela 3 - Modelo linear com distribuição gama analisando interferência do uso de antipsicóticos e duração da epilepsia na densidade do receptor 5-HT1A.

5-HT1A	Exp(B)	95%CI	p ¹
<i>Antipsicóticos</i>	0.431	0.267 – 0.724	0.003
<i>Duração da Epilepsia</i>	1.021	1.003 - 1.042	0.026

¹GLM (modelo linear com distribuição gama)

Não houve diferença entre a duração da epilepsia e o uso de ISRS (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.200$), o uso de antipsicóticos (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.476$) ou o tipo de transtorno psiquiátrico (Kruskal-Wallis: $p = 0.586$). Para avaliar a interferência de fatores confusionais, foi utilizado o Modelo Linear Generalizado. Através dessa análise, nós encontramos que a densidade do receptor 5-HT1A está ligada à duração da epilepsia, havendo um aumento em 2.1% a cada ano de epilepsia ($p = 0.026$).

A densidade do receptor 5-HT1A não foi associada com a presença de transtornos psiquiátricos (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.267$) ou outras variáveis clínicas, incluindo a idade de início da epilepsia (coeficiente de correlação de Spearman: $p = 0.265$), a idade na cirurgia (coeficiente de correlação de Spearman: $p = 0.347$), a frequência das crises epiléticas (Kruskal-Wallis: $p = 0.268$), a frequência das crises TCG (Kruskal-Wallis: $p = 0.485$), a presença de crises TCG (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.321$), o histórico de EME (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.153$) ou o histórico de crises febris (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.258$). Além disto, não houve associação com o tipo de transtorno psiquiátrico (Kruskal-Wallis: $p = 0.177$) ou com o uso de ISRS (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.626$).

Não houve diferenças estatísticas na densidade do receptor 5-HT1A entre pacientes com monoterapia ou politerapia (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.406$).

- Receptor 5-HT2A

A análise da densidade dos receptores 5-HT2A foi realizada em 30 amostras de tecido hipocampal. As características demográficas e clínicas desse grupo de pacientes encontra-se no **ANEXO 5**.

A densidade do receptor 5-HT2A não esteve associada a nenhuma das variáveis clínicas da epilepsia, à presença ou tipo de transtorno psiquiátrico e ao uso de medicação psicotrópica, como detalhado a seguir.

Não houve diferença entre densidade do receptor 5-HT2A e a idade de início da epilepsia (coeficiente de correlação de Spearman: $p = 0.363$), a idade na cirurgia (coeficiente de correlação de Spearman: $p = 0.574$), a duração da epilepsia (coeficiente de Spearman: $p = 0.724$), a frequência das crises epiléticas (Kruskal-Wallis: $p = 0.761$), a frequência das crises TCG (Kruskal-Wallis: $p = 0.452$), a presença de crises TCG (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.723$), o histórico de EME (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.252$) e o histórico de crises febris (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.908$). Também não houve diferença em relação à presença de transtorno psiquiátrico (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.614$), ao tipo de transtorno psiquiátrico (Kruskal-Wallis: $p = 0.440$), ao uso de ISRS (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.400$) e ao uso de medicação antipsicótica (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.590$).

Não houve diferenças na densidade do receptor 5-HT2A entre os pacientes com monoterapia e politerapia (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.686$).

- Receptor 5-HT6

A análise da densidade dos receptores 5-HT6 foi realizada em 15 amostras de tecido hipocampal. As características demográficas e clínicas desse grupo de pacientes encontra-se no **ANEXO 6**.

Foi encontrada uma associação entre a menor densidade do receptor 5-HT6 e a história de EME (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.0027$) (**Tabela 4**, **Figura 5**).

Tabela 4 - Análise de densidade receptor 5-HT6 nos pacientes com e sem história de EME

<i>História de EME</i>	N	Média de 5-HT6	Desvio Padrão
Ausente	13	284438	26052
Presente	2	181594	8618

Paciente 1
EME ausente
Densidade: 313.625

Paciente 2
EME presente
Densidade: 187.688

Figura 5 - Amostras de membranas incubadas com anticorpo anti-receptor 5-HT6, comparando a densidade do receptor entre pacientes com e sem história de EME.

A densidade do receptor 5-HT6 não foi associada a nenhuma das outras variáveis clínicas da epilepsia, à presença ou tipo de transtorno psiquiátrico e ao uso de medicação psicotrópica, como detalhado a seguir.

Não houve diferença significativa entre a densidade do receptor 5-HT6 e a idade de início da epilepsia (coeficiente de correlação de Spearman: $p = 0.363$), a idade na cirurgia (coeficiente de correlação de Spearman: $p = 0.325$), a duração da epilepsia (coeficiente de Spearman: $p = 0.775$), a frequência das crises epiléticas (Teste de Jonckheere-Terpstra: $p = 0.176$), frequência das crises TCG (Teste de Jonckheere-Terpstra $p = 0.589$), a presença de crises TCG (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.358$) e o histórico de crises febris (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.885$). Também não houve diferença em relação à presença de transtorno psiquiátrico (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.105$), ao tipo de transtorno psiquiátrico (Kruskal-Wallis: $p = 0.318$), ao uso de ISRS (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.279$) e ao uso de medicação antipsicótica (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.516$).

Não houve diferenças na densidade do receptor 5-HT6 entre os pacientes com monoterapia e politerapia (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.665$).

- Receptor 5-HT7

A análise da densidade dos receptores 5-HT7 foi realizada em 31 amostras de tecido hipocampal. As características demográficas e clínicas desse grupo de pacientes encontra-se no **ANEXO 7**.

A densidade do receptor 5-HT7 não foi associada a nenhuma das variáveis clínicas da epilepsia, à presença ou tipo de transtorno psiquiátrico e ao uso de medicação psicotrópica, como detalhado a seguir.

Não houve diferença significativa entre a densidade de 5-HT7 e a idade de início da epilepsia (coeficiente de correlação de Spearman: $p = 0.067$), a idade na cirurgia (coeficiente de correlação de Spearman: $p = 0.074$), a duração da epilepsia (coeficiente de correlação de Spearman: $p = 0.439$), a frequência das crises epiléticas (Kruskal-Wallis Test: $p = 0.066$), a frequência das crises TCG (Jonckheere-Terpstra: $p = 0.136$), a presença de crises TCG (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.320$), o histórico de EME (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.469$) e o histórico de crises febris (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.133$). Também não houve diferença em relação à presença de transtorno psiquiátrico (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.857$), ao tipo de transtorno psiquiátrico (Kruskal-Wallis: $p = 0.306$), ao uso de ISRS (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.333$) e ao uso de medicação antipsicótica (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.943$).

Não houve diferenças na densidade do receptor 5-HT7 entre os pacientes com monoterapia e politerapia (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.464$).

Densidade do Transportador Serotoninérgico

A análise da densidade do 5-HTT foi realizada em 24 amostras de tecido hipocampal. As características demográficas e clínicas desse grupo de pacientes encontra-se no **ANEXO 8**.

A densidade do 5-HTT não foi associada a nenhuma das variáveis clínicas da epilepsia, à presença ou tipo de transtorno psiquiátrico e ao uso de medicação psicotrópica, como detalhado a seguir.

Não houve diferença significativa entre a densidade de 5-HTT e a idade de início da epilepsia (coeficiente de correlação de Spearman: $p = 0.10$), a idade na cirurgia (coeficiente de correlação de Spearman: $p = 0.927$), a duração da epilepsia (coeficiente de Spearman: $p = 0.738$), a frequência das crises epiléticas (Teste de Jonckheere-Terpstra: $p = 0.250$), a frequência das crises TCG (Teste de Jonckheere-Terpstra: $p = 0.871$), a presença de crises TCG (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.128$), o histórico de EME (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.174$) e o histórico de crises febris (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.614$). Também não houve diferença em relação à presença de transtorno psiquiátrico (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.602$), ao tipo de transtorno psiquiátrico (Kruskal-Wallis: $p = 0.128$), ao uso de ISRS (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.434$) e ao uso de medicação antipsicótica (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.374$).

Não houve diferenças na densidade do 5-HTT entre os pacientes com monoterapia e politerapia (Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0.571$).

6. *DISCUSSÃO*

Esse estudo analisou o tecido hipocampal de pacientes com epilepsia focal do lobo temporal farmacorresistente, em um grupo etiológicamente homogêneo, composto somente por pacientes com EH, com o objetivo de avaliar o perfil serotoninérgico e buscar possíveis associações com variáveis clínicas da epilepsia ou com a presença de transtornos psiquiátricos nestes pacientes.

O estudo pode ser dividido em duas etapas, sendo a etapa inicial a dosagem da concentração de serotonina, através do método de HPLC, avaliada no tecido hipocampal de 44 pacientes com ELT-EH farmacorresistente.

A segunda etapa, realizada através do método de Western Blot, consistiu na análise da densidade do 5-HTT em 24 amostras hipocampais, dos receptores 5-HT1A em 34 amostras hipocampais, 5-HT2A em 30 amostras hipocampais, 5-HT6 em 15 amostras hipocampais e 5-HT7 em 31 amostras hipocampais. Todas essas amostras provenientes do grupo de 44 pacientes com ELT-EH farmacorresistente, que tiveram os níveis de concentração de serotonina dosados. Não foi possível a realização da análise da densidade de todos os receptores em todas as amostras hipocampais, pois a análise dependia do tamanho da amostra hipocampal viável, ou seja, tamanho da ressecção cirúrgica e a viabilidade do tecido; que por ser uma amostra de tecido de sistema nervoso central era limitada em tamanho e acesso. Além disso, outro fator interferente foi a viabilidade da análise, por vezes, com necessidade de repetição, por algum erro ou falha nas etapas analíticas.

Diversos estudos tentam demonstrar o papel das vias serotoninérgicas na epileptogênese, bem como a associação da epilepsia com os transtornos psiquiátricos. Entretanto, os dados em tecido cerebral humano são escassos sendo realizados com amostras heterogêneas quanto à sua etiologia.

6.1 Variáveis Clínicas da Epilepsia

I) Concentração de 5-HT

Este foi o primeiro estudo de concentração de serotonina no hipocampo humano, associado com variáveis clínicas da epilepsia e realizado em uma amostra etiologicamente homogênea de epilepsia.

No nosso estudo encontramos que níveis mais baixos de serotonina estavam associados com a presença de CTCG anteriores ou atuais. Esses achados são condizentes com evidências em modelos animais que demonstram que diminuições dos níveis de serotonina estão associados com a fisiopatologia de CTCG.

O modelo animal de epilepsia-induzida por MSO demonstra um envolvimento hipocampal, por vezes, com características semelhantes à esclerose hipocampal humana (Eid *et al.*, 2008). Neste modelo, a administração de MSO induz a CTCG (Cloix, Tahi, Martin, *et al.*, 2010) e a uma redução significativa dos níveis de 5-HT (Cloix, Tahi, Boissonnet, *et al.*, 2010). Além disso, a administração concomitante de 5-HT e MSO, atrasa o início das

crises epiléticas (Picard *et al.*, 2011). Evidenciando o importante papel do 5-HT na predisposição à CTCG.

Nos modelos GEPR foi demonstrado que depleções de 5-HT estão associadas com a predisposição à crise epilética (Dailey, Mishra, *et al.*, 1992; Jobe *et al.*, 1995). A linhagem GEPR-9, que possui crises de maior gravidade, mimetizando de forma muito aproximada as crises TCG em humanos, exibe uma redução significativa nas concentrações de 5-HT (Statnick *et al.*, 1996). Nessa linhagem, a destruição de terminações serotoninérgicas, com subsequente diminuição da concentração de 5-HT, bloqueia o efeito supressor de CTCG exercido pela fluoxetina (Yan *et al.*, 1994; Merrill *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2013). Além disso, a maioria das crises TCG são TCG bilaterais, ou seja, ocorrem secundariamente em resposta a crises límbicas (Jobe e Dailey, 2000).

No modelo da epilepsia induzido pela pilocarpina, modelo que cursa com alterações que reproduzem uma ELT humana, já foi demonstrado que os níveis de 5-HT estão diminuídos na fase crônica da epilepsia (Lin *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2016). Além disso, agentes que facilitam a liberação de 5-HT hipocampal diminuem a gravidade das crises epiléticas, indicativos, pela escala utilizada, de menor chance de CTCG ou EME (Smolders *et al.*, 2008).

Estudos usando HPLC em tecido cortical humano evidenciaram que os níveis de 5-HT estavam aumentados ou inalterados nas áreas epileptogênicas, quando comparado a áreas não epileptogênicas de pacientes com epilepsia focal (Pintor *et al.*, 1990; Naffah-Mazzacoratti *et al.*, 1996; Broderick *et al.*, 2000). Estudos utilizando microvoltametria encontraram que níveis de 5-HT estavam diminuídos no tecido hipocampal, mas não no tecido neocortical de pacientes com ELT mesial, quando comparado com pacientes com epilepsia

temporal neocortical (Broderick *et al.*, 2000). Os achados desses estudos não podem ser comparados com os nossos dados, visto que diferem quanto ao desenho de estudo, tamanho e caracterização amostral, ou por não fazer associação com variáveis clínicas da epilepsia. Porém, enfatizam a importância da homogeneidade referente à etiologia da epilepsia quanto aos dados encontrados.

Nos nossos resultados, foram realizadas análises para descartar a interferência de fatores confusionais. Observamos que, na nossa amostra, os FAEs foram igualmente distribuídos entre os grupos de pacientes, sem diferenças significativas entre os pacientes com ou sem CTCG, assim como os psicotrópicos não alteraram nossos resultados. Entretanto, o uso de ISRS esteve associado com uma redução no número de CTCG e alteraram os níveis de 5-HT nos pacientes com CTCG. Diversos estudos sugerem que os ISRS estão relacionados com uma diminuição na frequência das crises epiléticas (Dailey, Yan, *et al.*, 1992; Vermoesen *et al.*, 2012), com evidências desta ação relacionada com mecanismos serotoninérgicos (Dailey, Yan, *et al.*, 1992; Yan *et al.*, 1994; Browning *et al.*, 1997; Merrill *et al.*, 2007). Podemos inferir dos nossos resultados que, nos pacientes com epilepsia apresentando crises TCG, o tratamento com ISRS poderia ser benéfico.

II) Receptor 5-HT1A

No nosso estudo foi demonstrado que uma maior duração da epilepsia esteve associada com uma maior densidade do receptor 5-HT1A. Apesar de sua ampla distribuição no cérebro, com uma maior densidade no sistema

límbico, particularmente no hipocampo, são escassos os estudos que estudam o papel do receptor 5-HT1A com variáveis clínicas da epilepsia, sendo este o primeiro estudo avaliando a densidade deste receptor, com variáveis clínicas da epilepsia, no hipocampo de uma amostra etiologicamente homogênea de pacientes com ELT-EH.

Os achados da literatura avaliando o receptor 5-HT1A em tecido cortical humano possuem resultados divergentes quando áreas ou etiologias distintas são analisadas. Nos pacientes com epilepsia farmacorresistente, com etiologia heterogênea, quando comparados com pacientes controles, foi demonstrada uma diminuição da densidade do receptor 5-HT1A na amígdala (Graebenitz *et al.*, 2011) e um aumento da sua densidade no tecido temporal neocortical (Palomero-Gallagher *et al.*, 2012). Em outro estudo, também realizado em tecido temporal neocortical, porém, em pacientes com ELT-EH, foi encontrada uma menor densidade dos receptores 5-HT1A no tecido neocortical, quando comparado aos controles (Rocha *et al.*, 2007). Este último estudo foi o único a pesquisar associações com variáveis clínicas, não encontrando nenhuma relação com a expressão do receptor 5-HT1A. Os achados são importantes para evidenciar que diferenças na região cortical estudada ou na etiologia da epilepsia podem gerar resultados opostos. Ressaltando o fato de que não podemos compará-los com os nossos achados, por divergências da região proveniente do tecido cortical estudado, da etiologia da epilepsia, no desenho do estudo ou metodologia utilizada para análise.

A nossa hipótese para o nosso achado é que o aumento da densidade do receptor 5-HT1A seria secundário a uma tentativa de compensar uma diminuição da sua atividade. Essa hipótese estaria em concordância com

diversos estudos de neuroimagem funcional, que demonstraram uma diminuição da afinidade de ligação do receptor 5-HT_{1A} ipsilateral à área epileptogênica de pacientes com ELT (Merlet *et al.*, 2004; Giovacchini *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2007; Didelot *et al.*, 2008; Liew *et al.*, 2009; Assem-Hilger *et al.*, 2010). Neste caso, quanto maior a duração da epilepsia, maior o tempo que a região hipocampal estaria sendo submetida a uma diminuição da atividade dos receptores 5-HT_{1A} e maior o tempo de efeito compensatório, com aumento da densidade dos receptores.

III) Receptor 5-HT₆

Nosso estudo encontrou que a presença de EME esteve associada com uma densidade diminuída do receptor 5-HT₆.

No modelo animal de epilepsia pela pilocarpina, na fase aguda, quando as crises límbicas estão mais propensas à evolução para EME, estudos demonstraram que os níveis de 5-HT se encontram elevados (Cavalheiro *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 2013). O que poderia explicar uma diminuição por efeito compensatório dos receptores 5-HT₆. Entretanto, neste modelo, na fase crônica, ocorre uma diminuição da concentração de 5-HT (Lin *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2016), o que poderia explicar um aumento compensatório dos receptores serotoninérgicos, ao contrário de uma diminuição. Baseado nesta explicação, na nossa amostra, esperaríamos ter encontrado um aumento da densidade, tendo em vista que os nossos pacientes já estavam em uma fase crônica da epilepsia. Estudos em tecido cerebral humano, que mostraram um aumento da concentração de serotonina nas áreas epileptogênicas, podendo explicar um efeito compensatório do receptor, não possuíam uma amostra

homogênea quanto à etiologia (Pintor *et al.*, 1990; Naffah-Mazzacoratti *et al.*, 1996) o que, como já foi descrito previamente, interferiria nos resultados esperados.

Estudos que avaliaram o receptor 5-HT₆, mostraram dados contrários aos nossos. Lin *et al.* (2017) demonstraram, em camundongos, que o EME induzido pela pilocarpina gerava um aumento na expressão do receptor 5-HT₆. Similarmente, Wang *et al.* (2015) que, através da técnica de Western Blot, avaliaram a expressão do receptor 5-HT₆ no hipocampo e neocórtex de ratos modelos de epilepsia pela administração da pilocarpina, encontraram que crises epiléticas induziram o aumento do receptor 5-HT₆, sendo esta expressão maior durante a fase de recorrência das crises epiléticas. Este mesmo estudo comparou o tecido temporal neocortical de 25 pacientes com ELT farmacorresistente com controles e encontrou um aumento da densidade do receptor 5-HT₆.

A discordância entre os nossos resultados e estudos anteriores pode ser decorrente do tipo de epilepsia estudada, como também do maior fator limitante desta parte do estudo - o tamanho da amostra (15 pacientes). Estudos posteriores com maior número de pacientes com ELT-EH poderão corroborar nossos resultados.

IV) Receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₇

As análises dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₇ não evidenciaram nenhuma associação com variáveis clínicas da epilepsia.

Há dois estudos associando o receptor 5-HT_{2A} ou o receptor 5-HT₇ com variáveis clínicas da epilepsia (Yang *et al.*, 2012; Buchanan *et al.*, 2014).

Entretanto, essas associações foram realizadas através do uso de drogas, antagonistas ou agonistas de receptores, em modelos animais, e sem determinar exatamente o local de ação desse efeito. O estudo em tecido humano - temporal neocortical - evidenciou uma associação entre a expressão do receptor 5-HT₇ e a duração da epilepsia (Rocha *et al.*, 2007). Nossos resultados não podem ser comparados ao estudo citado dada a região analisada.

Uma possível explicação para os nossos achados negativos seria de que alterações nestas vias serotoninérgicas em outras regiões do sistema nervoso possam estar associadas a variáveis clínicas da epilepsia. Estudos com GEPR evidenciaram que alterações serotoninérgicas em diferentes regiões estão associadas com variáveis clínicas distintas da epilepsia (Jobe *et al.*, 1986). Alterações serotoninérgicas no colículo superior foram associadas com diminuição ou supressão das crises epiléticas (Dailey, Mishra, *et al.*, 1992; Merrill *et al.*, 2007) e o padrão de deficiência serotoninérgica no estriado, que na linhagem GEPR-9 difere do padrão da linhagem GEPR-3, já foi implicado na gravidade das crises epiléticas (Dailey, Mishra, *et al.*, 1992). Além disso, acreditamos que a presença de outros mecanismos, incluindo diferentes vias de ação, também agem contribuindo para alterações de variáveis clínicas da epilepsia (Peixoto-Santos *et al.*, 2012; Kandratavicius, Rosa-Neto, *et al.*, 2013).

V) Transportador de 5-HT

No estudo de Rocha *et al.* (2007) a afinidade de ligação do 5-HTT em tecido humano de pacientes com ELT-EH estava diminuída em todas as

camadas do neocórtex temporal, quando comparado com controles, entretanto, as alterações no 5-HTT não estiveram relacionadas com variáveis clínicas da epilepsia, assim como no nosso estudo. Não há, no entanto, nenhum estudo anterior ao nosso avaliando o hipocampo desses pacientes e regiões distintas podem levar a resultados diferentes.

Acreditamos que a possível explicação para os nossos achados, em relação ao 5-HTT, seria semelhante às dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₇.

6.2 Transtorno Psiquiátrico

No nosso estudo, a concentração de serotonina, a densidade dos receptores e do transportador não estiveram associados com a presença ou ausência de transtornos psiquiátricos, nos pacientes com ELT-EH.

Na literatura, dados evidenciam o importante papel das vias serotoninérgicas na gênese dos transtornos psiquiátricos (Parsey *et al.*, 2010; Mulinari, 2012; Dayer, 2014; Donaldson e Hen, 2015). Baseado em evidências clínicas e experimentais, estudos sugerem mecanismos patogênicos comuns entre epilepsia e transtorno psiquiátrico, incluindo alterações das vias serotoninérgicas (Jobe *et al.*, 1999; Kanner, 2005; 2009). Entretanto, como enfatizado anteriormente, não existem estudos em tecido hipocampal humano que tenham avaliado a associação das vias serotoninérgicas nos pacientes com ELT-EH.

Uma limitação do nosso estudo, em relação à análise dos dados relacionados com a presença de transtornos psiquiátricos, foi a falta da comparação com tecido hipocampal de controles. Já foi demonstrada uma redução dos níveis de 5-HT em camundongos submetidos à injeção de

pilocarpina, que evoluíam com epilepsia e sintomas de depressão, quando comparados a camundongos controle (Mazarati *et al.*, 2008). Em tecido cerebral humano *post mortem*, Dekker *et al.* (2018) avaliaram, através do método HPLC, concentrações monoaminérgicas no hipocampo de pacientes com síndrome de Down ou doença de Alzheimer e pacientes controles – pacientes sem doenças neurológicas ou psiquiátricas. Nos pacientes controles foi encontrada uma concentração média de 5-HT de 87.8 ng/g, valor muito acima da média dos nossos pacientes de 0.3366 ng/mg ou aproximadamente 0.00033 ng/g. Ao comparar estes níveis com os encontrados no nosso estudo, poderíamos extrapolar e inferir a possibilidade de que se tivéssemos um grupo controle, teríamos encontrado níveis mais elevados de concentração de 5-HT.

Uma hipótese para nossos achados negativos seria a de que alterações nas vias serotoninérgicas poderiam ocorrer tanto na fisiopatologia da epilepsia, como na dos transtornos psiquiátricos, sendo necessário a associação com outros fatores para diferenciação na presença de um ou outro. Ou seja, diferentes padrões de interações com outras vias determinando a presença de transtorno psiquiátrico isolado, epilepsia isolada ou ambos conjuntamente.

No estudo anteriormente citado de Mazarati *et al.* (2008), após administração do inibidor de recaptação da serotonina, a fluoxetina, observa-se uma diminuição da degradação de serotonina, porém, sem melhora dos sintomas depressivos. Outros estudos já demonstraram esta falta de resposta dos ISRS na depressão de modelos animais de epilepsia (Pineda *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2016). Estes achados sugerem que as manifestações psiquiátricas, nos pacientes com epilepsia, possuem mecanismos

fisiopatogênicos distintos, possivelmente com o envolvimento de outras vias na modulação do transtorno psiquiátrico associado com epilepsia, como já descritos por outros estudos (Gattaz *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2012; Kandratavicius, Monteiro, Assirati, *et al.*, 2013; Kandratavicius, Monteiro, Hallak, *et al.*, 2013). Além disso, deve-se levar em consideração que outras regiões do sistema nervoso central possam estar associadas (Briellmann *et al.*, 2007).

6.3 Limitações do estudo

Além das limitações previamente relatadas, como falta de grupo controle e subgrupos de tamanhos heterogêneos, outro ponto importante e limitante dos nossos dados, seria uma possível interferência do uso crônico de FAEs e psicotrópicos, que agem na neurotransmissão serotoninérgica, através dos receptores serotoninérgicos, tanto ao nível pré-sináptico, quanto pós-sináptico.

Em todas as análises, foram realizados testes para afastar a interferência destes fatores. Quanto ao uso de FAEs, acreditamos que não foi um fator de interferência significativo nos nossos achados, visto que os subgrupos possuíam distribuições semelhantes. Quanto aos psicotrópicos, foram observadas alterações nos nossos resultados. Na análise da concentração de 5-HT, foi evidenciado uma interferência do uso de ISRS na frequência das CTCG, como discutido previamente. Além disto, nas análises dos achados do receptor 5-HT_{1A}, foi evidenciado que o uso de antipsicóticos interferiu na densidade do receptor 5-HT_{1A}, através da diminuição da densidade. Os antipsicóticos, agem de forma direta ou indireta nos receptores

5-HT_{1A}, entretanto, a literatura descreve este efeito através de uma estimulação destes receptores (Assié *et al.*, 2005; Meltzer e Massey, 2011). Embora deva-se considerar que este achado possa ser devido interferência de uma análise entre subgrupos de tamanhos heterogêneos, entre pacientes com e sem uso de antipsicóticos (n = 26 e n = 8, respectivamente), também não devemos ignorar o fato de que o uso de drogas psicoativas possa ter interferido nos nossos achados.

7. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que níveis mais baixos de concentração de 5-HT estiveram associados com a presença de CTCG, em 44 hipocampus de pacientes com ELT-EH; sugerindo que uma depleção do 5-HT poderia estar associado com a gênese de CTCG e consequentemente, com uma maior gravidade da epilepsia. Além disso, demonstrou que a densidade aumentada do receptor 5-HT_{1A} esteve associada com maior duração da epilepsia, em 34 hipocampus. Resultado que postulamos se tratar de um efeito compensatório aos níveis cronicamente baixos da concentração de 5-HT.

A análise de 15 hipocampus de pacientes com ELT-EH demonstrou que a densidade diminuída do receptor 5-HT₆ esteve associado com presença de EME. Achado que acreditamos não ser representativo, devido diferenças no tamanho amostral entre os grupos, com número de pacientes com história de EME muito reduzido.

A análise de 30, 31 e 24 hipocampus demonstrou que a densidade do receptor 5-HT_{2A}, do receptor 5-HT₇ e do 5-HTT, respectivamente, não estiveram associadas com variáveis clínicas da epilepsia. Achados que acreditamos ser devido mecanismos serotoninérgicos agindo em diferentes regiões do sistema nervoso ou diferentes mecanismos e diferentes vias interagindo entre si na gênese da epilepsia e de suas variáveis clínicas.

Nossos achados reforçam a importância das vias serotoninérgicas na epileptogênese, através dos achados associados com algumas variáveis clínicas da epilepsia. Mais estudos são necessários para melhor elucidação desses mecanismos, em especial em tecido cortical humano.

A análise da concentração de 5-HT e da densidade dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆ e 5-HT₇, além do 5-HTT, não estiveram associados com a presença de transtornos psiquiátricos. Achados que acreditamos ser por conta de mecanismos fisiopatológicos operantes em comum envolvendo as vias serotoninérgicas na gênese da epilepsia e dos transtornos psiquiátricos, com diferenças na interação com outras vias levando a presença ou ausência de cada um deles. Sendo necessário, mais estudos, para definição desta hipótese.

ANEXO 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL****1. NOME:**.....DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:

CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** Atividade serotoninérgica
em hipocampus de pacientes com epilepsia do lobo temporal com e sem
transtornos psiquiátricos**2. PESQUISADOR:** Dra. Kette Dualibi Ramos Valente**CARGO/FUNÇÃO:** Diretora Técnica do Laboratório de Neurofisiologia Clínica do
Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP.**UNIDADE DO HCFMUSP:** Instituto de Psiquiatria**3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**RISCO MÍNIMO ☒RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses.

responsável_____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou

Rubrica do pesquisador_____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP****1 – Desenho do estudo e objetivo(s):**

O(A) Sr(a) participará em um estudo muito importante para que possamos compreender melhor a sua doença – epilepsia de lobo temporal – e para que no futuro possamos ajudar pacientes com esta doença. Este estudo somente será realizado com pacientes como o (a) Sr(a) ou seja que já tem cirurgia agendada para tratamento da sua epilepsia. Por isso, é importante que o (a) Sr(a) entendam o que vai ser explicado sobre este estudo para que eu saiba se concorda em participar. Há no seu cérebro, assim como em todos os cérebros, uma substância chamada serotonina que é muito importante. Se esta substância diminui, os pacientes podem apresentar depressão. Nós acreditamos, tendo como base estudos que foram feitos no passado com cérebros de animais, que esta substância possa estar diminuída no cérebro dos pacientes com epilepsia e em especial naqueles que tem depressão e epilepsia mais grave. As pessoas com epilepsia do lobo temporal têm mais depressão que pessoas da população que não tem epilepsia. Até hoje ninguém estudou o cérebro de pessoas com epilepsia para obter esta informação. Portanto, este é o primeiro estudo que será feito desta forma. Durante a cirurgia, a qual o (a) Sr(a) será submetido para tratar ou curar a sua epilepsia,

como foi indicado pela equipe clínica que o acompanha, a parte doente do cérebro que causa as crises chamada hipocampo é removida. Nós iremos estudar esta parte que já foi removida durante a cirurgia para qual o (a) senhor (a) tem que ser submetido (a) para controle de suas crises, portanto este estudo nada altera a conduta e o tratamento que o (a) senhor (a) recebe na rotina da sua avaliação diagnóstica e terapêutica.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:

Se o Sr.(a) decidir participar, faremos uma entrevista para conhecermos seu histórico e da sua família. Durante a cirurgia para melhora da epilepsia, iremos pegar uma amostra da parte doente do seu cérebro, aquela que seria tirada de qualquer forma para o controle das suas crises. Esta amostra (tecido) não seria utilizada para nenhum outro fim. A única diferença é que uma amostra que seria desprezada será utilizada para o estudo. Estas amostras serão guardadas em uma geladeira, chamada freezer, em uma temperatura muito baixa. Estas amostras serão usadas para estudar a substância que acreditamos estar baixa, a serotonina. Todo o material será identificado por códigos, para que ninguém possa saber o nome da pessoa que aceitar participar da pesquisa. A parte não utilizada neste estudo não será utilizada em estudos futuros.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:

1. A entrevista será feita com o(a) Sr (a) no dia que for melhor para o (a) Sr(a) e que seja uma data na qual o(a) Sr(a) tenha que vir ao hospital para consulta ou realização de exames, assim não alteraremos o seu dia-a-dia ou a

sua rotina. Nesta entrevista que dura 30 a 40 minutos, iremos perguntar algumas informações do Sr(a) e de sua família. As informações são a data que suas crises começaram, quantas e quais crises epiléticas o(a) Sr(a) tem, quais os medicamentos que já foram usados e quais está usando agora. Também será perguntado sobre tratamento com psiquiatra que já tenha acontecido ou que esteja acontecendo, qual a doença que está sendo tratada e qual o remédio que está sendo usado para esta doença.

2. Quando a cirurgia acabar, iremos pegar uma amostra do cérebro que está doente, hipocampo. Nossa equipe não terá contato algum com o procedimento cirúrgico de rotina. Este tecido será dado para nossa equipe e será levado para o freezer do Laboratório de Pesquisa.

3. Iremos guardar a parte do cérebro doente em uma geladeira de temperatura muito baixa, freezer, no Laboratório de Neurociências do Instituto de Psiquiatria - HCFMUSP. Seu nome não estará na sua parte doente, mas sim um código, para ninguém saiba que aquela parte doente é sua.

4. Serão usadas técnicas de laboratório com nomes – HPLC e *Western Blot* – que servem para medir a quantidade de serotonina na amostra de hipocampo que nós guardamos. Esta fase do estudo, que é a mais importante para nós e que leva mais tempo, não precisa de sua participação. O (A) Sr (a) não mais será incomodado após a entrevista inicial pela nossa equipe,

devendo manter o seu tratamento aqui como o que geralmente faz, com os seus médicos e cirurgião responsável pela cirurgia.

5. Caso o (a) Sr. (a) decida depois da cirurgia que nós não podemos usar a amostra de tecido que foi coletada, simplesmente deve nos avisar para que não façamos as análises.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos:

Não há desconforto que seja causado por esta pesquisa, exceto da sua entrevista que como já dito será realizada em dia da sua conveniência, ou seja, em um dia no qual o Sr(a) venha ou HC ou mesmo durante o período que já estiver internado para ser operado. Desta forma, não haverá necessidade de transporte extra até o Hospital. A entrevista não tem risco.

A amostra coletada não trará desconforto ou risco para o(a) Sr(a) pois como já expliquei não interfere na sua cirurgia. O(A) Sr.(a) seria operado de qualquer forma e este seria o pedaço de tecido a ser removido. Portanto, está dentro do procedimento de rotina da sua cirurgia. Nenhum exame a mais é necessário e nada muda na sua cirurgia.

O contato na entrevista será feito com o (a) Sr(a), somente para responder as perguntas que o (a) Sr(a) concordar. O contato na hora de pegar a parte doente do cérebro será feito somente com o neurocirurgião e após a sua

cirurgia, não atrapalhando ela, iremos guardar o material com código para ninguém saber de quem ele é.

responsável_____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

5 – Benefícios para o participante:

No trabalho, não há benefício direto para o participante.

É possível, mas não garantido, que os pacientes com algumas destas doenças possam beneficiar-se dos resultados deste estudo no futuro, bem como seus familiares. O nosso estudo pretende dar um maior esclarecimento das causas da epilepsia e da depressão. Com estes conhecimentos, esperamos conseguir um melhor tratamento das doenças citadas.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:

Não há.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você poderá entrar em contato com os profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Kette Dualibi Ramos

Valente que pode ser encontrada no endereço Instituto de Psiquiatria, térreo, setor de Eletrencefalografia - *Rua Dr.Ovídio Pires de Campos, 785 – Cerqueira César – SP*. Telefone(s): 2661-6518 ou 2661-7921. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

09 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

10 – Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

11 – Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensações financeiras relacionada à sua participação.

responsável_____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou

Rubrica do pesquisador_____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

12 – Os dados obtidos e o material coletado serão utilizados somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Atividade serotoninérgica em hipocampus de pacientes com epilepsia do lobo temporal com e sem transtornos psiquiátricos".

Eu discuti com a Dra. Kette Dualibi Ramos Valente sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data___/___/___

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

(Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

ANEXO 2. ARTIGO PUBLICADO: *EPILEPSY RESEARCH* (2015), 18 - 25*Epilepsy Research* (2015) 111, 18–25 journal homepage: www.elsevier.com/locate/epilepsyres

Hippocampal serotonin depletion is related to the presence of generalized tonic–clonic seizures, but not to psychiatric disorders in patients with temporal lobe epilepsy

Natascha C. da Fonseca^{a,*}, Helena P.G. Joaquim^b,
Leda L. Talib^b, Sílvia de Vincentiis^{a,c}, Wagner F. Gattaz^b,
Kette D. Valente^{a,c,d}

^a *Laboratory of Clinical Neurophysiology, Institute of Psychiatry, University of São Paulo School of Medicine Hospital das Clínicas, São Paulo, SP, Brazil*

^b *Laboratory of Neuroscience, Institute of Psychiatry, University of São Paulo School of Medicine Hospital das Clínicas, São Paulo, SP, Brazil*

^c *Laboratory of Neuroimaging, Institute of Psychiatry, University of São Paulo School of Medicine Hospital das Clínicas, São Paulo, SP, Brazil*

^d *Center for the Support of Research in Applied Neuroscience, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil*

Received 6 August 2014; received in revised form 18 December 2014; accepted 30 December 2014

Available online 17 January 2015

Summary

Objective: Previous studies suggest that concentration of serotonin ([5-HT]) plays a pathogenic role in various types of epilepsy inhibiting seizures. However, most have not considered the clinical variables of epilepsy, and all of these studies included small and heterogeneous samples with refractory epilepsy, regardless of etiology. In this work, we measured [5-HT]s in hippocampal tissues from a large series of patients with refractory temporal lobe epilepsy caused by hippocampal sclerosis who underwent epilepsy surgery and evaluated the relationship between [5-HT] and epilepsy-related clinical variables and psychiatric disorders.

Methods: We included 44 patients with refractory unilateral TLE-HS who underwent surgical treatment for epilepsy. Hippocampal samples were collected, and serotonin concentrations were measured with high-pressure liquid chromatography (HPLC).

Results: Lower [5-HT]s were correlated with a history of GTC seizures (Student's *t*-test: *p* 0.041). There were no differences in [5-HT]s according to the other clinical variables and the presence of psychiatric disorders.

* Corresponding author. Tel.: +55 4291285656.

E-mail address: nataschafonseca@gmail.com (N.C. da Fonseca).

ANEXO 2. ARTIGO PUBLICADO: *EPILEPSY RESEARCH* (2015), 18 - 25

Hippocampal serotonin depletion is related to the presence of generalized tonic-clonic seizures

19

Significance: Our findings demonstrated that serotonin depletion in the hippocampus play an important role in some aspects of the severity of epilepsy (i.e., the presence of GTC seizures) in a homogeneous sample of patients with refractory temporal lobe epilepsy determined by hippocampal sclerosis, but not with the presence of psychiatric disorders.
© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Depletion of serotonin (5-HT) and the consequent upregulation of its postsynaptic receptors have been associated with epilepsy in a genetically epilepsy-prone rat (GEPR) model (Dailey et al., 1992; Jobe and Dailey, 2000).

Agents that elevate extracellular 5-HT levels inhibit focal and generalized seizures (Bagdy et al., 2007). 5-HT plays a pathogenic role in various types of epilepsy in genetically epilepsy-prone rat (GEPR) models. In GEPR models, certain strains with innate noradrenergic and serotonergic pre- and post-synaptic transmission deficits and those with abnormal serotonergic innervations with in the brain are associated with low postsynaptic 5-HT_{1A} receptor densities in the hippocampus. Additionally, further reductions in serotonin concentration are correlated with epilepsy severity (Clough et al., 1998; Dailey et al., 1992; Ryu et al., 1999). Therefore, there is evidence, particularly from animal models, that suggests that [5HT] is associated with epilepsy and epilepsy severity.

Temporal lobe epilepsy (TLE) caused by hippocampal sclerosis (HS) is the leading cause of focal refractory epilepsy in adults (Beleza, 2009; Veriano et al., 2010), and most patients with this condition are referred for epilepsy surgery because current treatments with anti-epileptic drugs are ineffective.

Although TLE-HS represents an excellent model for the study of the role of [5HT]s in humans, scarce data from human brain tissue, particularly the hippocampal tissue of patients with epilepsy, are available (Broderick et al., 2000; Louw et al., 1989; Mori et al., 1987; Naffah-Mazzacoratti et al., 1996; Pacia et al., 2001; Pintor et al., 1990).

Earlier studies (Broderick et al., 2000; Louw et al., 1989; Mori et al., 1987; Pacia et al., 2001) have not considered the clinical variables of epilepsy, and all of these studies included small and heterogeneous samples with refractory epilepsy, regardless of etiology.

In the present study, we measured [5-HT]s in hippocampal tissues from a large series of patients with refractory TLE-HS who underwent epilepsy surgery and evaluated the relationship between [5HT] and epilepsy-related clinical variables. We also studied the relationship between [5HT] and the presence of psychiatric comorbidities.

Methods

Patients

We included patients with refractory unilateral TLE-HS (Kwan et al., 2010). The study sample comprised 44 patients (24 female; mean age of 35.0 ± 13.1 years). All 44 patients had previously been evaluated with 3-Tesla MRI. In all cases,

the imaging studies revealed decreased hippocampal volumes on T1-weighted images and increased hippocampal signal intensities on T2-weighted fluid-attenuated inversion recovery sequences. Video-electroencephalographic studies were performed at the Laboratory of Clinical Neurophysiology of the University of Sao Paulo.

Due to refractory epilepsy, these patients underwent standard anterior temporal lobectomies. Samples of the hippocampi were collected during the surgeries and stored at -80°C for subsequent analyses.

The mean age of these patients at the onset of epilepsy was 8.9 years ($SD \pm 7.4$), and the mean duration of epilepsy was 26.0 years ($SD \pm 12.0$). Psychiatric comorbidities were present in 45.4% (20/44) of the patients and included the following: mood disorders only in 36.4% (16/44; 15 with depression and one with anxiety), and psychosis only in 18.2% (8/44). The clinical characteristics of these patients are shown in Table 1.

All patients were taking antiepileptic drugs (AEDs), either as monotherapy or polytherapy, at time of surgery. With the exception of one patient on monotherapy with phenytoin, all of the patients on monotherapy were using carbamazepine or oxcarbazepine. The AEDs that were associated with the polytherapy were topiramate, phenobarbital, valproate and benzodiazepines.

Materials

HPLC-grade methanol, HPLC-grade acetonitrile, sodium phosphate and perchloric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Serotonin (5-HT), external standard (5-methoxytryptamine) and sodium dodecyl sulfate were purchased from Sigma (Steinheim, Germany).

Procedures

Liquid chromatography

High-pressure liquid chromatography (HPLC) was performed on a Shimadzu system (LC 10AD VP; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a fluorescence detector (RF-10AXL; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) on a Lichrospher 100 C8 5- μm reversed-phase column (250 mm $\times$ 4.0 mm; Varian, Sunnyvale, CA, USA). The mobile phase contained 0.1M sodium phosphate and 10 μM sodium dodecyl sulfate in water, acetonitrile and methanol (70:15:15 v/v/v). Elution was performed by a single gradient, and flow rate was maintained at 0.8 ml/min. The excitation and emission wavelengths of the fluorescence detector were set to 330 and 450 nm, respectively. The injection volume was 50 μL . The acquisition and integration of the chromatograms were performed using Shimadzu Class-VP software.

ANEXO 2. ARTIGO PUBLICADO: *EPILEPSY RESEARCH (2015), 18 - 25*

Table 1 Clinical characterization of patients divided according the presence or absence of GTC seizure and their respective serotonin level.

Patient	Gender	Age at surgery (years)	Age of onset of epilepsy (years)	Duration of epilepsy (years)	Seizure frequency	History of Febrile Seizure	History of GTC seizures	Frequency of GTC seizures	History of SE	AEDs	SSRI/ antipsychotic	PD	[SHT]
1	F	13	5	7	W	+	+	S	—	OXC/BZD	—	De	0.17362
2	F	19	0.5	18	D	—	+	M	—	CBZ/PB/BZD	—	De	0.29598
3	F	47	6	41	M	+	+	M	—	OXC/BZD	—	De	0.1112
4	F	40	5	35	M	—	+	S	—	LMT/TPM/PB	—	De	0.3709
5	F	35	12	23	M	—	+	S	—	CBZ/LMT/BZD	—	De	0.198
6	F	39	9	30	M	—	+	S	—	CBZ/PHT	—	De	0.23724
7	M	29	16	13	W	+	+	S	—	CBZ/VPA/PB/BZD	SER/RISP	De	0.12853
8	F	41	3	38	W	—	+	S	+	PHT/PB	SER/HAL	De	0.20007
9	F	45	10	35	W	—	+	S	—	OXC/PB	—	A	0.29404
10	M	37	20	17	M	—	+	S	—	CBZ	—	P	0.72663
11	M	27	5	22	M	+	+	S	—	VPA/PB	—	P	0.38669
12	F	43	8	35	M	—	+	S	—	CBZ/PB	HAL	P	0.20204
13	F	41	18	23	D	—	+	M	—	PHT/BZD	—	P	0.32395
14	F	45	1	44	M	—	+	S	—	PHT/LMT/BZD	RISP	P	0.3596
15	M	44	21	23	W	—	+	S	—	CBZ/BZD	RISP	P	0.0916
16	F	53	1	52	M	—	+	S	—	PHT/PB	HAL	P	0.34724
17	M	35	9	26	D	—	+	S	—	CBZ/BZD	—	P	0.73225
18	M	22	1	21	W	—	+	S	+	CBZ/PB/BZD	—	N	0.19668
19	M	24	4	20	D	—	+	S	+	CBZ/BZD	—	N	0.30552
20	M	10	0.75	10	W	—	+	M	—	CBZ	RISP	N	0.16698
21	F	44	29	15	M	—	+	M	—	CBZ	—	N	0.31839
22	M	24	0.4	24	M	—	+	M	+	CBZ	—	N	0.24575
23	M	52	24	28	D	—	+	M	+	CBZ	—	N	0.30609
24	F	51	8	43	W	+	+	S	—	PHT/TPM/PB/BZD	—	N	0.1246
25	F	38	0.75	37	M	+	+	M	—	CBZ/BZD	—	N	0.37567
26	M	28	3	25	W	—	+	M	—	CBZ/PB	—	N	0.21955
27	M	42	1	41	M	—	+	S	+	OXC/LMT/BZD	—	N	0.63824
28	M	47	12	35	M	—	+	M	—	CBZ/PB	—	N	0.38804
29	F	33	21	12	W	—	+	S	—	CBZ/BZD	—	N	0.21996
30	F	41	14	27	W	—	—	—	—	PHT/TPM/PB	SER	De	0.644
31	M	15	3	12	W	+	—	—	—	CBZ	SER	De	0.39413
32	F	34	11	23	W	—	—	—	—	CBZ/VPA	SER	De	0.7222
33	F	43	12	29	M	+	—	—	—	CBZ/PB/BZD	SER	De	0.40736
34	F	37	21	16	M	—	—	—	—	CBZ/BZD	FLX	De	0.3856
35	F	41	14	27	W	—	—	—	—	CBZ/LMT/BZD	FLX	De	0.53789
36	M	17	1	16	M	—	—	—	—	CBZ/TPM/BZD	SERT/RISP/HAL	De	0.39573
37	F	69	9	60	M	—	—	—	—	CBZ/PB	—	N	0.1948
38	F	20	3	17	W	—	—	—	—	CBZ	—	N	0.25678
39	F	13	5	8	M	—	—	—	—	CBZ	—	N	0.49422
40	M	46	12	34	W	+	—	—	—	OXC/PB	—	N	0.28425
41	M	20	10	10	W	—	—	—	—	CBZ/PB	—	N	0.2416
42	M	29	5	24	M	—	—	—	—	CBZ/VPA/BZD	—	N	0.46865
43	M	50	16	34	M	—	—	—	—	CBZ/LMT/PB/PHT	—	N	0.17247
44	M	18	1	17	M	—	—	—	—	CBZ	—	N	0.5268

GTC: generalized tonic-clonic; SE: status epilepticus; PD: psychiatric disorder(s); D: daily; W: weekly; M: monthly; S: sporadic; De: depression; A: anxiety; P: psychosis; N: none; CBZ: carbamazepine; OXC: oxcarbazepine; PB: phenobarbital; PHT: phenytoin; LTG: lamotrigine; TPM: topiramate; VPA: valproic acid; BZD: benzodiazepine; SER: sertraline; FLX: fluoxetine; RISP: risperidone; HAL: haloperidol.

20

N. C. da Fonseca et al.

ANEXO 2. ARTIGO PUBLICADO: *EPILEPSY RESEARCH* (2015), 18 - 25

Hippocampal serotonin depletion is related to the presence of generalized tonic-clonic seizures

21

Table 2 Serotonin (5HT) mean and standard deviation.

Psychiatric disorder	N	5HT mean	Std. deviation
None	20	0.3060	0.13624
Depression	16	0.3451	0.17669
Psychosis	8	0.3963	0.22729
Total	44	0.3366	0.16919

Calibration standards

A 1-mg/ml stock solution of 5HT was prepared in sodium phosphate buffer. Working calibrators were prepared by dilution of the stock to concentrations of 50.0 ng/ml, 25.0 ng/ml, 10.0 ng/ml, 5.0 ng/ml, and 2.5 ng/ml. Stock solutions of external standard were prepared in 30 mM sodium phosphate buffer at pH 7.4, and the working external standard solution was 1 µg/ml.

Tissue preparation

The hippocampal samples were dissected and homogenized with 3.4M perchloric acid in a Potter S homogenizer (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) to a final concentration of 25 mg/ml. The homogenized samples were then sonicated for 30 s to lyse the membranes (VirSonic 100; Virtis, Gardiner, NY, USA), centrifuged at 14,000 × g at 4°C for 20 min (Himac CR22F-Hitachi, Tokyo, Japan), and stored at -80°C until use. The supernatants (250 µl) were mixed with 50-µl external standard solution and vortexed. The clear solutions were transferred to autosampler vials for analysis.

Serotonin concentrations

The 5HT peaks in each sample were identified according to their retention times and compared with the standard solutions. The retention time for the 5HT peak was 5.4 min. The concentrations are given in ng/mg. Calculus was applied to the area of the peak to determine the serotonin concentration (Table 2).

Statistical analyses

The following clinical variables were analyzed: age at epilepsy onset; epilepsy duration; presence and frequency of febrile seizure; presence and frequency of status epilepticus; frequency of generalized tonic-clonic [GTC] seizures; frequency of complex partial seizures; anti-epileptic drugs (mono-versus polytherapy); and the presence and type of psychiatric disorder (PD; Table 1).

The primary outcome measure was to study the association between GTC and 5-HT levels. Secondary clinical outcome was the presence of psychiatric disorders. For this reason, in the first analysis, we categorized patients in two groups: GTC+ (29 patients) and GTC- (15 patients) (Table 1).

We also categorized patients in PD+ (24 patients) and PD- (20 patients).

First analysis

The relationships between [5-HT] and the clinical variables were assessed with the following tests: (1)

Wilcoxon-Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test for independent variables depending on the number of groups; and (2) Spearman correlation coefficients for continuous variables. The association between GTC seizures and confounding variables was measured with Fisher's exact test.

Second analysis

To accommodate confounding factors, 5HT concentration association with independent variables was assessed with a gamma distributed generalized linear model.

The normality of the distributions of the values was verified via examination of quantile-quantile plots. Significance was set at 5%, and all tests were two-tailed.

The statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences, version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

In the hippocampal samples that were collected during the surgical procedures, the concentrations of 5-HT ranged from 0.0916 to 0.7323 ng/mg, and the mean concentration was 0.3366 ng/mg (Table 2).

We found that lower levels of 5-HT were correlated with a history of GTC seizures (Wilcoxon-Mann-Whitney test; p 0.019) as illustrated in Fig. 1. No differences in 5-HT levels were significantly associated with the other clinical variables.

Within the subgroup of patients with GTC seizures, there was no significant difference of the patients on polytherapy and those on monotherapy, considering benzodiazepines (Fisher's exact test; p 0.271) or not (Fisher's exact test; p 0.464); also no significant difference of the patients using antipsychotics (Fisher's exact test; p 0.226), with the presence of febrile seizure (Fisher's exact test; p 1.000) or status epilepticus (Fisher's exact test; p 0.134). Psychiatric disorders were equally represented in the patients with and without GTC seizures (Fisher's exact test; p 0.532).

The patients using selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) had fewer GTC seizures (Fisher's exact test; p 0.004). We analyzed if GTC and SSRI interfered in [5HT] at the same time, using GLM (generalized linear model with gamma distribution) with an interaction effect. The result is significant, indicating that in the group of patients with GTC seizures the use of SSRI alters significantly the [5HT] (p 0.011).

The 5-HT levels were not correlated with other clinical variables, including the presence or type of PD in TLE-HS (Wilcoxon-Mann-Whitney; p 0.334), the age at the onset of epilepsy (Spearman correlation coefficient; p 0.938), the duration of epilepsy (Spearman correlation coefficient; p 0.745), the frequency of seizures (Kruskal-Wallis; p 0.211), history of status epilepticus (Wilcoxon-Mann-Whitney; p 0.657) and history of febrile seizures (Wilcoxon-Mann-Whitney; p 0.250).

There were no differences in serotonin concentrations between the patients on monotherapy and those on polytherapy considering benzodiazepines (Wilcoxon-Mann-Whitney; p 0.179) or not (Wilcoxon-Mann-Whitney; p 0.302).

ANEXO 2. ARTIGO PUBLICADO: *EPILEPSY RESEARCH* (2015), 18 - 25

22

N.C. da Fonseca et al.

Fig. 1 Chromatograms of patient with GTC seizures (above) and patient without GTC seizures (below) history showing peak of 5HT at 5.4min and of external standard at 7.6 min. In the first case the concentration of 5HT is 0.17362 ng/mg and the second case is 0.25678 ng/mg. Concentration of 5HT is represented by the filled in green area.

ANEXO 2. ARTIGO PUBLICADO: *EPILEPSY RESEARCH* (2015), 18–25

Hippocampal serotonin depletion is related to the presence of generalized tonic-clonic seizures

23

Discussion

This study analyzed hippocampal tissue from patients with refractory TLE-HS and showed a reduced concentration of 5HT in the patients with past or current history of GTC seizures. These results agree with evidence from animal models that has demonstrated the role of 5-HT in the pathophysiology of GTC seizures. In the methionine sulfoximine (MOS)-induced rat model seizures that mimic GTC seizures, Cloix et al. (2010) found that 5-HT is involved in the control of the latency to seizures and that cortical 5HT levels are decreased at the onset of seizures. Picard et al. (2011) used the same model and also found that defective serotonergic neurotransmission could trigger increases in glycogen and seizure genesis. Classical studies with GEPR strains (i.e., GEPR-3 and GEPR-9) also suggest a potential role of serotonin in epileptogenesis (Dailey et al., 1989, 1992; Jobe et al., 1986, 1995; Jobe and Dailey, 2000). GEPR-9s were shown to have a marked genetically determined predisposition to seizures that closely mimics GTCs in humans (Jobe et al., 1995; Jobe and Dailey, 2000). Interestingly, in most GEPR-9s, GTCs occur secondarily in response to limbic seizures (Coffey et al., 1996; Jobe and Dailey, 2000). These studies have provided a basis for the tentative identification of areas of the brain in which monoaminergic abnormalities regulate seizure severity and susceptibility. In GEPR-9s and GEPR-3s, monoaminergic defects in areas such as the thalamus might regulate both the susceptibility to and severity of seizures. In other areas, such as the limbic system, defects might regulate only the severity or susceptibility. There is evidence supporting the concept that noradrenergic and serotonergic innervation act as determinants of seizure predisposition in GEPRs (Dailey et al., 1989, 1992; Jobe and Dailey, 2000).

Additionally, experimental data from the pilocarpine model of epilepsy in rats has shown that agents that facilitate hippocampal 5HT release decrease seizure severity, which is indicative of fewer GTC seizures or status epilepticus episodes (Smolders et al., 2008). Moreover, agents that decrease the content of serotonin in the raphe nuclei and hippocampus facilitate the induction of pilocarpine-induced status epilepticus during the acute period and increase the frequency of spontaneous seizures in the chronic phase (Trindade-Filho et al., 2008).

In our study, serotonin depletion was not associated with other epilepsy-related clinical variables, with the exception of the presence of GTC seizures. A possible explanation for this finding is that serotonin depletion in the hippocampus might be involved in the genesis of GTC seizures from limbic epilepsies, but the susceptibility to seizures might involve serotonin depletion in other regions, such as the superior colliculus (Merrill et al., 2007), and other serotonergic mechanisms. Rocha et al. (2012) evaluated the temporal neocortical tissues of patients with TLE-HS by autoradiography, finding that the patients in whom epileptic seizures began at young ages presented with reduced 5-HT7 binding. Similarly, patients with longer duration of the epilepsy and those with long-term history of antiepileptic drug administration exhibited reduced 5-HT4 and 5-HT7 binding. Different neurotransmitters and receptors might also be associated with epilepsy-related clinical variables

(Kandratavicius et al., 2013a; Li et al., 2014; Palomero-Gallagher et al., 2012; Rocha et al., 2012). This analysis is part of an ongoing study.

The effects of both antiepileptic and SSRI drugs on our results remain outstanding questions. In our group of patients with GTC, we found no differences related to the patients' therapies (i.e., monotherapy or polytherapy). The same analysis was performed for those with PD and produced similar results. Therefore, AED use was equally distributed across our groups (i.e., those with and without PD and those with and without GTC seizures). In contrast, SSRI use was associated with a reduced number of GTC seizures and also altered serotonin levels. Indeed, distinct studies have suggested that SSRIs significantly decrease spontaneous seizure frequency (Smolders et al., 2008; Vermoesen et al., 2012) and that one possible mechanism by which their produce anticonvulsant effects might be due to serotonergic increments (Browning et al., 1997; Favale et al., 1995; Favale et al., 2003; Merrill et al., 2007; Specchio et al., 2004; Vermoesen et al., 2012; Yan et al., 1994). We can infer from our results that an increase of hippocampal 5-HT levels could be correlated with a reduction of GTC seizures frequency. Therefore, treatments with SSRIs could benefit patients with GTC seizures. However, we cannot ignore that GCT+ and GCT- subpopulations ($N=29$ and 15 , respectively), are not homogeneous in terms of numbers, which may have interfered in our results. Nevertheless our study shows the importance of further work on the topic.

Studies using HPLC in human tissue have shown that 5HT and 5-hydroxyindoleacetic acid levels are increased (Louw et al., 1989; Naffah-Mazzacoratti et al., 1996; Pintor et al., 1990) or unaltered (Mori et al., 1987) in the spiking compared to non-spiking temporal cortices of patients with complex partial seizures. However, these previous studies evaluating serotonin concentrations in humans are not suitable for comparison with ours because the correlations of the serotonin levels with clinical variables were not examined or the study designs and sample sizes were quite different. Specifically, these other studies did not distinguish between distinct etiologies and were not restricted to HS.

Broderick et al. (2000), Pacia et al. (2001) studied small samples (<15 patients) to evaluate serotonin levels via microvoltammetry and found that 5HT levels are decreased in the hippocampi but not neocortical tissues of patients with TLE-HS compared to those with neocortical TLE (NTLE); these findings suggest that hippocampal sclerosis might cause 5HT depletion. These findings emphasize the importance of etiology and the study of homogeneous samples. It is possible that the serotonin levels we observed are decreased relative to those of non-epileptic patients and patients with epilepsies with other etiologies. The lack of controls for comparison is a limitation of our study.

We believe that decreased serotonergic function plays an important role in the pathophysiology of depression and that such a decrease might be a common mechanism that links epilepsy and mood disorders. In the present study, this correlation was negative. The heterogeneity of the group in terms of the type of PD might have interfered with our results. However, it is also possible that other mechanisms that are related to 5-HT are correlated with the presence of PD, such as altered serotonin receptor or transporter functions (Drevets et al., 1999; Hasler et al., 2007; Hung et al.,

ANEXO 2. ARTIGO PUBLICADO: *EPILEPSY RESEARCH (2015), 18–25*

24

N.C. da Fonseca et al.

2011; Sargent et al., 2000; Schenkel et al., 2011). Nonetheless, other mechanisms (Gattaz et al., 2011; Kandratavicius et al., 2013b) are also probably related to these findings.

Conclusions

In conclusion, our findings suggest that serotonin depletion in the hippocampus is associated with the presence of GTC seizures. We postulate that the epilepsy-related clinical variables and comorbidities are multifaceted and that different mechanisms are involved in the pathogenesis of epilepsy. Studies of the receptors and transporters might help to elucidate the roles of 5 HT and other clinical variables, such as mood disorders.

Conflict of interest statement

The authors state that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

Dr. Valente is the recipient of a grant from the CNPq (National Council for Scientific and Technological Development - 307262/2011) and FAPESP (Agency of the Sao Paulo Research Foundation - 2013/11361-4). Drs. Valente and Fonseca are recipients of a grant from the FAPESP (Agency of the Sao Paulo Research Foundation - 05/56464-9)

References

- Bagdy, G., Kecskemeti, V., Riba, P., Jakus, R., 2007. Serotonin and epilepsy. *J. Neurochem.* 100 (4), 857–873.
- Beleza, P., 2009. Refractory epilepsy: a clinically oriented review. *Eur. Neurol.* 62 (2), 65–71.
- Broderick, P.A., Pacia, S.V., Doyle, W.K., Devinsky, O., 2000. Monoamine neurotransmitters in resected hippocampal subparcellations from neocortical and mesial temporal lobe epilepsy patients: in situ microvoltammetric studies. *Brain Res.* 878 (1–2), 48–63.
- Browning, R.A., Wood, A.V., Merrill, M.A., Dailey, J.W., Jobe, P.C., 1997. Enhancement of the anticonvulsant effect of fluoxetine following blockade of 5HT_{1A} receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 336 (1), 1–6.
- Cloix, J.F., Tahi, Z., Boissonnet, A., Hévor, T., 2010. Brain glycogen and neurotransmitter levels in fast and slow methionine sulfoximine-selected mice. *Exp. Neurol.* 225 (2), 274–283.
- Clough, R.W., Peterson, B.R., Steenbergen, J.L., Jobe, P.C., Browning, R.A., Mishra, P.K., 1998. Neurite extension of developing noradrenergic neurons is impaired in genetically epilepsy-prone rats (GEPR-3s): an in vitro study in locus coeruleus. *Epilepsy Res.* 29 (2), 135–146.
- Coffey, L.L., Reith, M.E., Chen, N.H., Mishra, P.K., Jobe, P.C., 1996. Amygdala kindling of forebrain seizures and the occurrence of brainstem seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsia* 37 (2), 189–197.
- Dailey, J.W., Reigel, C.E., Mishra, P.K., et al., 1989. Neurology of seizure predisposition in the genetically epilepsy-prone rat. *Epilepsy Res.* 3, 3–17.
- Dailey, J.W., Mishra, P.K., Ko, K.H., Penny, J.E., Jobe, P.C., 1992. Serotonergic abnormalities in the central nervous system of seizure-naïve genetically epilepsy prone rats. *Life Sci.* 50 (4), 319–326.
- Drevets, W.C., Frank, E., Price, J., Kupfer, D.J., Holt, D., Greer, P.J., Huang, Y., Gauthier, C., Mathis, C., 1999. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol. Psychiatry* 46 (10), 1375–1387.
- Favale, E., Rubino, V., Mainardi, P., Lunardi, G., Albano, C., 1995. Anticonvulsant effect of fluoxetine in humans. *Neurology* 45 (10), 1926–1927.
- Favale, E., Audenino, D., Cocito, L., Albano, C., 2003. The anticonvulsant effect of citalopram as an indirect evidence of serotonergic impairment in human epileptogenesis. *Seizure* 12 (5), 316–318.
- Gattaz, W.F., Valente, K.D., Raposo, N.R.B., Vicentis, S., Talib, L.L., 2011. Increased PLA₂ activity in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy and psychosis. *J. Psychiatr. Res.* 45 (12), 1617–1620.
- Hasler, G., Bonwetsch, R., Giovacchini, G., Toczek, M.T., Bagic, A., Luckenbaugh, D.A., Drevets, W.C., Theodore, W.H., 2007. 5HT_{1A} Receptor binding in temporal lobe epilepsy patients with and without major depression. *Biol. Psychiatry* 62 (11), 1258–1264.
- Hung, C.F., Lung, F.W., Chen, C.H., O’Nions, E., Hung, T.H., Chong, M.Y., Wu, C.K., When, J.K., Lin, P.Y., 2011. Association between suicide attempt and a tri-allelic functional polymorphism in serotonin transporter gene promoter in Chinese patients with schizophrenia. *Neurosci. Lett.* 504 (3), 242–246.
- Jobe, P.C., Dailey, J.W., 2000. Genetically epilepsy-prone rats (GEPRs) in drug research. *CNS Drug Rev.* 6 (3), 241–260.
- Jobe, P.C., Dailey, J.W., Reigel, C.E., 1986. Noradrenergic and serotonergic determinants of seizure susceptibility and severity in genetically epilepsy-prone rats. *Life Sci.* 39 (9), 775–782.
- Jobe, P.C., Mishra, P.K., Adams-Curtis, L.E., Deoskar, V.U., Ko, K.H., Browning, R.A., Dailey, J.W., 1995. The genetically epilepsy-prone rat (GEPR). *Ital. J. Neurol. Sci.* 16 (1–2), 91–99.
- Kandratavicius, L., Rosa-Neto, P., Monteiro, M.R., Guiot, M.C., Assiri Jr., J.A., Calotti, C.G., Kobayashi, E., Leite, J.P., 2013a. Distinct increased metabotropic glutamate receptor type 5 (mGluR5) in temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis. *Hippocampus* 23 (12), 1212–1230.
- Kandratavicius, L., Monteiro, M.R., Assiri Jr., J.A., Carlotti, C.G., Hallak, J.E., Leite, J.P., 2013b. Neurotrophins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 72 (11), 1029–1042.
- Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A.T., Brodie, M.J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshé, S.L., Perucca, E., Wiebe, S., French, J., 2010. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc task force of the ILAE Commission on Therapeutics Strategies. *Epilepsia* 51 (6), 1069–1077.
- Li, B., Wang, L., Sun, Z., Zhou, Y., Shao, D., Zhao, J., Song, Y., Lv, J., Dong, X., Liu, C., Wang, P., Zhang, X., Cui, R., 2014. The anticonvulsant effects of SR 57227 on pentylenetetrazole-induced seizure in mice. *PLoS ONE* 9 (4), e93158.
- Louw, D., Sutherland, G.R., Glavin, G.B., Girvin, J., 1989. A study of monoamines metabolism in human epilepsy. *Can. J. Neurol. Sci.* 16 (4), 394–397.
- Merrill, M.A., Clough, R.W., Dailey, J.W., Jobe, P.C., Browning, R.A., 2007. Localization of the serotonergic terminal fields modulating seizures in the genetically epilepsy-prone rat. *Epilepsy Res.* 76 (2–3), 93–102.
- Mori, A., Hiramatsu, M., Namba, S., Nishimoto, A., Ohmoto, T., Mayanagi, Y., Asakura, T., 1987. Decreased dopamine level in the epileptic focus. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 56 (2), 157–164.
- Naffah-Mazzacoratti, M.G., Amado, D., Culbert, A., Gronich, G., Marino, R., Calderazzo, L., Cavalheiro, E.A., 1996. Monoamines and their metabolites in cerebrospinal fluid and temporal cortex of epileptic patients. *Epilepsy Res.* 25 (2), 133–137.

ANEXO 2. ARTIGO PUBLICADO: *EPILEPSY RESEARCH* (2015), 18–25

Hippocampal serotonin depletion is related to the presence of generalized tonic-clonic seizures

25

- Pacia, S.V., Doble, W.K., Broderick, P.A., 2001. Biogenic amines in the human neocortex in patients with neocortical and mesial temporal lobe epilepsy: identification with in situ microvoltammetry. *Brain Res.* 899 (1–2), 106–111.
- Palomero-Gallagher, N., Schleicher, A., Bidmon, H.J., Pannek, H.W., Hans, V., Gorji, A., Speckmann, E.J., Zilles, K., 2012. Multireceptor analysis in human neocortex reveals complex alterations of receptor ligand binding in focal epilepsies. *Epilepsia* 3 (11), 1987–1997.
- Picard, M., Cloix, J.F., Hevor, T.K., 2011. Serotonergic neurotransmission plays a major role in the action of the glycogenic convulsant methionine sulfoximine. *Neurosci. Res.* 70 (3), 313–320.
- Pintor, M., Mefford, I.N., Hutter, I., Pocotte, S.L., Wyler, A.R., Nadi, N.S., 1990. Levels of biogenic amines, their metabolites, and tyrosine hydroxylase in the human epileptic temporal cortex. *Synapse* 5 (2), 152–156.
- Rocha, L., Alonso-Venegas, M., Villeda-Hernández, J., Mújica, M., Cisneros-Franco, J.M., López-Gómez, M., Zavala-Tecuapetla, C., Frias-Soria, C.L., Segovia-Vila, J., Borsodi, A., 2012. Dopamine abnormalities in the neocortex of patients with temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 45 (1), 499–507.
- Ryu, J.R., Jobe, P.C., Milbrandt, J.C., Mishra, P.K., Clough, R.W., Browning, R.A., Dailey, J.W., Seo, D.O., Ko, K.H., 1999. Morphological deficits in noradrenergic neurons in GEPR-9s stem from abnormalities in both the locus coeruleus and its target tissues. *Exp. Neurol.* 156 (1), 84–91.
- Sargent, P.A., Kjaer, K.H., Bench, C.J., Rabiner, E.A., Messa, C., Meyer, J., Gunn, R.N., Grasby, P.M., Cowen, P.J., 2000. Brain serotonin 1A receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635. *Arch. Gen. Psychiatry* 57 (2), 174–180.
- Schenkel, L.C., Bragatti, J.A., Becker, J.A., Torres, C.M., Martin, K.C., Souza, A.C., Manfro, G.G., Leistner-Segal, S., Bianchin, M.M., 2011. Serotonin gene polymorphisms and psychiatry comorbidities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 12 (5), 1–7.
- Smolders, I., Clinckers, R., Meurs, A., De Bundel, D., Portelli, J., Ebinger, G., Michotte, Y., 2008. Direct enhancement of hippocampal dopamine or serotonin levels as a pharmacodynamic measure of combined antidepressant-anticonvulsant action. *Neuropharmacology* 54 (6), 1017–1028.
- Specchio, L.M., Iudice, A., Specchio, N., La Neve, A., Spinelli, A., Galli, R., Rocchi, R., Olivelli, M., de Tommaso, M., Pizzanelli, C., Murri, L., 2004. Citalopram as treatment of depression in patients with epilepsy. *Clin. Neuropharmacol.* 27 (3), 133–136.
- Trindade-Filho, E.M., Castro-Neto, E.F., Carvalho, R., Lima, E., Scorza, F.A., Amado, D., Naffah-Mazzacoratti, M.G., Cavaleiro, E.A., 2008. Serotonin depletion effects on the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res.* 82 (2–3), 194–199.
- Veriano Jr., A., Capovilla, G., Fattore, C., Franco, V., Gambardella, A., Guerrini, R., La Briola, F., Ladogana, M., Rosati, E., Specchio, L.M., Striano, S., Perucca, E., 2010. Characteristics of a large population of patients with refractory epilepsy attending tertiary referral centers in Italy. *Epilepsia* 51 (5), 921–925.
- Vermoesen, K., Messie, A., Smolders, I., Clinckers, R., 2012. The antidepressants citalopram and reboxetine reduce seizure frequency in rats with chronic epilepsy. *Epilepsia* 53 (5), 870–878.
- Yan, Q.S., Jobe, P.C., Dailey, J.W., 1994. Evidence that a serotonergic mechanism is involved in the anticonvulsant effect of fluoxetine in genetically epilepsy-prone rats. *Eur. J. Pharmacol.* 252 (1), 105–112.

ANEXO 3. ARTIGO PUBLICADO: *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY*

ORIGINAL ARTICLE

5-hydroxytryptamine_{1A} receptor density in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy is associated with disease durationN. C. Fonseca^a , H. P. G. Joaquim^b, L. L. Talib^b, S. Vincentis^{a,c}, W. F. Gattaz^b and K. D. Valente^{a,c}^aInstitute and Department of Psychiatry, University of São Paulo, São Paulo; ^bLaboratory of Neuroscience, Institute and Department of Psychiatry, Clinical Hospital, University of São Paulo, São Paulo; and ^cLaboratory of Neuroimaging, Institute and Department of Psychiatry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil**Keywords:**

epilepsy surgery, hippocampal sclerosis, hippocampus, refractory, serotonin, western blotting

Received 29 July 2016

Accepted 4 January 2017

European Journal of Neurology 2017, 24: 602–608

doi:10.1111/ene.13252

Background and purpose: To date, no study has evaluated the association between serotonin receptor density and clinical variables in patients with temporal lobe epilepsy caused by hippocampal sclerosis (TLE-HS) using hippocampal tissue. We evaluated 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor (5-HT_{1A}) density in hippocampal tissue from patients with TLE-HS.**Methods:** We analyzed the hippocampal tissue of 34 patients with pharmacoresistant unilateral TLE-HS. 5-HT_{1A} density was measured using semi-quantitative western blotting.**Results:** There was an association between higher density of 5-HT_{1A} and longer duration of epilepsy (Spearman correlation: $P = 0.040$; generalized linear model: $P = 0.026$).**Conclusions:** This study demonstrated that hippocampal 5-HT_{1A} density is associated with epilepsy duration in patients with TLE-HS. The authors postulate that this may represent a potential regulatory enhancement of endogenous serotonergic neurotransmission in response to prolonged and enduring epileptiform activity in the hippocampal tissue of patients with pharmacoresistant TLE-HS.**Introduction**

There is evidence, from animal models, suggesting that there is an association between serotonin (5-HT), 5-HT receptors (5-HTRs) and epilepsy [1,2]. Serotonergic regulatory mechanisms have been described in genetically epilepsy-prone rats, an audiogenic seizure model [3–6]. In one model, depletion of 5-HT density increases seizure severity and 5-HT replacement attenuates it [5]. It was also demonstrated that 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor (5-HT_{1A}) agonist blocked epileptiform activity in a model of epilepsy induced by picrotoxin, a GABA_A receptor antagonist, and this antiepileptic effect was blocked by 5-HT_{1A} antagonist, suggesting a significant role of 5-HT_{1A} in

anticonvulsant properties [7]. Additionally, in a study with kindled cats, a model of epilepsy produced by focal electrical stimulation, 5-HT_{1A} agonist led to an increase in the threshold of generalized seizures [8]. A study with amygdala-kindled rats has also demonstrated that 5-HT_{1A} agonist slightly suppressed the development of behavioral and electrographic seizures [9].

Neuroimaging studies using positron emission tomography (PET) with a selective 5-HT_{1A} tracer demonstrated a decrease in 5-HT_{1A} binding potential in the epileptogenic area of patients with temporal lobe epilepsy (TLE), mainly in those with depression [10–13].

Temporal lobe epilepsy caused by hippocampal sclerosis (HS) is the most common cause of pharmacoresistant focal epilepsy referred to surgery [14] and it represents an excellent model for neurophysiologic studies. However, there are few studies in human

Correspondence: K. D. Valente and N. C. Fonseca, Rua Dr. Ovídio Pres Campos, 785, São Paulo, SP 05403-010, Brazil (tel.: +55 11 30795493; fax: +55 11 30795493; e-mail: kette.valente@hcfm.usp.br and natschafonseca@usp.br).

ANEXO 3. ARTIGO PUBLICADO: *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY* (2017), 24(4): 602 – 608

SEROTONIN RECEPTORS AND EPILEPSY 603

brain tissue that have evaluated the role of 5-HTRs in epileptogenesis [15–17]. Grabenitz *et al.* [16] analyzed the amygdala of an etiologically heterogeneous sample of patients with TLE and found a lower density (downregulation) of 5-HT1AR. The same group [15] observed higher 5-HT1AR density when analyzing the middle temporal gyrus of pharmacoresistant TLE in a similar sample. A possible reason for these contradictory results is the region analyzed.

Our previous work demonstrated that 5-HT density is downregulated in the resected hippocampal tissue of patients with TLE-HS [18]. It is reasonable to assume that 5-HTRs are upregulated, resulting in an increased density.

To date, no studies have evaluated these 5-HTRs in hippocampal tissue, especially in an etiologically homogeneous sample of patients with TLE-HS. The lack of human experimental data led us to investigate 5-HTRs in the human hippocampus. In the present study, we measured 5-HT1AR density in hippocampal tissues from a series of patients with pharmacoresistant TLE-HS and evaluated the relationship between 5-HT1AR and epilepsy-related clinical variables. We also studied the association between the 5-HT1AR density and the presence of psychiatric comorbidities.

Materials and methods

Patients

The study sample comprised the hippocampal tissue of 34 patients [18 female (52.9%); mean age 35.3 ± 12.6 years] with TLE-HS [19]. Samples of the hippocampi were collected during the surgeries and stored at -70°C for subsequent analyses.

The mean age at the onset of epilepsy was 9.7 years ($\text{SD} \pm 7.4$) and the average duration of epilepsy was 25.5 years ($\text{SD} \pm 11.6$). Psychiatric comorbidities occurred in 55.9% (19/34) and included mood disorders in 35.3% (12/34) and psychosis in 20.6% (7/34). Generalized tonic-clonic (GTC) seizures, status epilepticus and febrile seizures occurred in 61.8% (21/34), 8.8% (3/34) and 17.6% (6/34) of these patients. All patients were taking antiepileptic drugs either as monotherapy or polytherapy at the time of surgery (Table 1). Fourteen (41.2%) patients were using psychotropic medication [antipsychotics and selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)].

Methods

The local ethics committee of the University of São Paulo approved this study. A written informed consent was obtained from all participants or parents.

Hippocampal tissue preparation

The hippocampal tissue was dissected and stored at -70°C and then homogenized in a lysis solution (radio immunoprecipitation assay buffer plus phosphatase and protease inhibitors) to a final tissue concentration of 200 mg/mL. We stored homogenate aliquots at -70°C .

Western blotting technique

Before electrophoresis, total protein levels were determined by the detergent-compatible Protein Assay (Bio-Rad, Life Sciences Group, Hercules, CA, USA) using a modification of the Lowry method [20]. For each sample, 25 mg of protein was separated by electrophoresis on 10% polyacrylamide gels (160 V, 90 min) and transferred to nitrocellulose membranes (250 mA, 60 min). The protein molecular weight marker was from Bio-Rad. Unspecific binding was blocked for 1 h at room temperature of 21°C with 5% non-fat milk in 0.02% Tris-Buffered Saline 0.1% – Tween 20% (TBS-T).

Membranes were incubated overnight with a monoclonal, primary antibody against 5-HT1AR (anti-5-HT1AR antibody, ab64994, Abcam, Cambridge, MA, USA). The antibody was diluted 1:1000 in 0.02% TBS-T. Membranes were then washed and incubated for 1 h with the secondary antibody (anti-rabbit secondary antibody, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluted 1:20 000 in 0.02% TBS-T and subsequently washed with 0.02% TBS-T. Enhanced chemiluminescence (ECL Select; GE Life Sciences, Marlborough, MA, USA) reagent was poured onto the membranes, and photography and densitometry of distinct bands were performed using ChemImager 4000 system and v5.5 software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). We analyzed each sample in duplicate. The method was semiquantitative, so we compared the intensity of density between samples.

Statistical analysis

We analyzed age at epilepsy onset, epilepsy duration, presence and frequency of febrile seizures, presence and frequency of status epilepticus, presence and frequency of GTC seizures, frequency of dyscognitive seizures and antiepileptic drugs (monotherapy versus polytherapy). We also evaluated the use of SSRIs, antipsychotic drugs and the presence and type of psychiatric disorder.

First, we assessed the relationships between 5-HT1AR and the clinical variables with: (i) Wilcoxon–Mann–Whitney test or Kruskal–Wallis test for independent variables depending on the number of

ANEXO 3. ARTIGO PUBLICADO: *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY* (2017), 24(4): 602 – 608

604 N. C. FONSECA ET AL.

Table 1 Patient characteristics

Gender	Age at surgery (years)	Age of onset of epilepsy (years)	Seizure frequency	GTC frequency	SE	Febriile seizure	Psychiatric disorder	AED	Psychotropic	5-HT1A
M	10	0.75	W	MO	–	–	–	CBZ	RISP	37 674
F	13	5	MO	–	–	–	–	CBZ	–	38 493
M	15	3	W	–	–	+	De	CBZ	SER	39 312
M	17	1	MO	–	–	–	De	CBZ/TPM/BZD	SER/RISP/HAL	58 968
M	18	1	MO	–	–	–	–	CBZ	–	150 696
M	20	10	S	–	–	–	–	CBZ/PB	–	61 425
M	22	1	W	S	+	–	–	CBZ/PB/BZD	–	315 315
M	24	0.4	MO	MO	+	–	–	CBZ	–	244 062
M	28	5	MO	S	–	+	P	VPA/PB	HAL	42 407
M	29	16	W	S	–	+	De	CBZ/VPA/PB/BZD	SER/RISP	38 194
M	29	5	MO	–	–	–	–	CBZ/VPA/BZD	–	171 990
F	33	21	W	S	–	–	–	CBZ/BZD	–	68 796
F	34	11	W	–	–	–	De	CBZ/VPA	SER	199 017
M	35	9	D	S	–	–	P	CBZ/BZD	–	41 769
F	35	12	MO	S	–	–	De	CBZ/LMT/BZD	–	45 864
M	37	20	MO	S	–	–	P	CBZ	–	42 588
F	37	21	MO	–	–	–	De	CBZ/BZD	FLX	121 212
F	38	0.75	MO	MO	–	+	–	CBZ/BZD	–	130 221
F	39	9	MO	S	–	–	De	CBZ/PHT	–	321 867
F	40	5	MO	S	–	–	De	LMT/TPM/PB	–	115 479
F	41	14	W	–	–	–	De	CBZ/LMT/BZD	FLX	36 855
F	41	18	D	MO	–	–	P	PHT/BZD	RISP	36 855
F	41	14	W	–	–	–	De	PHT/TPM/PB	SER	327 609
M	42	1	MO	S	+	–	–	OXC/LMT/BZD	–	61 425
F	43	8	MO	S	–	–	P	CBZ/PB	HAL	76 167
F	43	12	MO	–	–	+	De	CBZ	SER	61 425
M	44	21	W	S	–	–	P	CBZ/BZD	RISP	46 683
F	44	29	MO	MO	–	–	–	CBZ	–	82 719
F	45	1	MO	S	–	–	P	PHT/LMT/BZD	RISP	87 633
F	45	10	W	S	–	–	A	OXC/PB	–	144 965
M	47	12	MO	MO	–	–	–	CBZ/PB	–	36 855
M	50	16	MO	–	–	–	–	CBZ/PHT/LMT/PB	–	115 479
F	51	8	W	S	–	+	–	PHT/TPM/PB/BZD	–	72 072
F	69	9	MO	–	–	–	–	CBZ/PB	–	329 238

5-HT1A, 5-hydroxytryptamine1A; A, anxiety; AED, antiepileptic drug; BZD, benzodiazepine; CBZ, carbamazepine; D, daily; De, depression; F, female; FLX, fluoxetine; GTC, generalized tonic-clonic; HAL, haloperidol; LMT, lamotrigine; M, male; MO, monthly; OXC, oxcarbazepine; P, psychosis; PB, phenobarbital; PHT, phenytoin; S, sporadic; SE, status epilepticus; SER, sertraline; RISP, risperidone; TPM, topiramate; VPA, valproic acid; W, weekly.

groups, and (ii) Spearman correlation coefficient for continuous and ordinal variables.

Second, the associations of 5-HT1AR density with independent variables were assessed with a gamma-distributed generalized linear model to accommodate confounding factors. We verified the normality of the distributions of the values via examination of quantile–quantile plots.

Significance was set at 5%, and all tests were two-tailed. We used the Statistical Package for the Social Sciences, version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

There was an association between higher density of 5-HT1AR and longer duration of epilepsy (Spearman

coefficient: $P = 0.040$; gamma distributed generalized linear model (GLM): $P = 0.026$) (Table 2, Fig. 1).

There was no significant difference in epilepsy duration related to the use of SSRIs (Wilcoxon–Mann–Whitney: $P = 0.200$) or the use of antipsychotics (Wilcoxon–Mann–Whitney: $P = 0.476$) and the type of psychiatric disease (Kruskal–Wallis: $P = 0.586$). We used the GLM to evaluate the interference of confounding factors in our results. By using this analysis, we found that 5-HT1AR density increased by 2.1% with each year of epilepsy ($P = 0.026$).

The 5-HT1AR was not associated with the presence of a psychiatric disorder (Wilcoxon–Mann–Whitney: $P = 0.267$) or other clinical variables including age at the onset of epilepsy (Spearman correlation: $P = 0.265$), age at surgery (Spearman correlation: $P =$

ANEXO 3. ARTIGO PUBLICADO: *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY* (2017), 24(4): 602 – 608

SEROTONIN RECEPTORS AND EPILEPSY 605

Table 2 Correlation between 5-hydroxytryptamine1A (5-HT1A) receptors and epilepsy clinical variable

	5-HT1A	
	Spearman correlation	P-value
Age at surgery (years)	0.166	0.347
Age of onset of epilepsy (years)	-0.197	0.265
Duration of epilepsy (years)	0.354	0.040

Bold indicates significance.

Figure 1 Representative western blotting films revealed by chemiluminescence showing 5-hydroxytryptamine1A (5-HT1A) expression at a band size of 46 kDa. Samples were analyzed in duplicate for each patient (column 1 and 2) and the receptor density was converted to numeric numbers electronically by ChemImager 4000 system and v5.5 software. Patient A, epilepsy duration of 60 years and 5-HT1A receptor density average of 329.238. Patient B, epilepsy duration of 37 years and 5-HT1A receptor density average of 130.221.

0.347), frequency of seizures (Kruskal–Wallis: $P = 0.268$), incidence of GTC seizures (Kruskal–Wallis: $P = 0.485$), presence of GTC seizures (Wilcoxon–Mann–Whitney: $P = 0.321$), history of status epilepticus (Wilcoxon–Mann–Whitney: $P = 0.153$) or history of febrile seizures (Wilcoxon–Mann–Whitney: $P = 0.258$). Furthermore, there was no association with the type of psychiatric disorder (Kruskal–Wallis: $P = 0.177$) or use of SSRIs (Wilcoxon–Mann–Whitney: $P = 0.626$) (Table 3, Fig. 2).

There were no differences in 5-HT1AR densities between the patients on monotherapy and those on polytherapy (Wilcoxon–Mann–Whitney: $P = 0.406$).

Discussion

In our study, we measured 5-HT1AR density using western blotting, a technique often used for protein detection [21]. Western blotting is used to evaluate the protein density of different types of receptors in animal and human cortical tissue [22–24], including serotonergic receptors [25,26]. Few studies have evaluated serotonergic receptors in human cortical tissue. Furthermore, the limited studies available differ in the methodology employed and the region used to determine 5-HT1AR, i.e. amygdala [16] and neocortical region [15,17].

There is a wide distribution of 5-HT1ARs throughout the brain. However, the highest density is found in the limbic system, particularly the hippocampus. Due to the importance of the hippocampus, we

Table 3 Correlation between 5-hydroxytryptamine1A (5-HT1A) receptors and epilepsy clinical variable

	n	5-HT1A		
		Mean	SD	P-value
Psychiatric disorders ^a				
None	15	131.913,60	96.990,13	0.177
Mood disorders	12	120.709,33	106.286,67	
Psychosis	7	53.586,00	19.836,36	
Gender ^b				
Female	18	127.582,00	100.662,97	0.152
Male	16	94.115,13	84.585,08	
Febrile seizure ^b				
Absent	28	122.060,25	99.315,35	0.258
Present	6	64.105,17	35.089,77	
GTC seizures ^b				
Absent	13	131.670,00	102.336,31	0.321
Present	21	99.552,76	88.066,25	
SE ^b				
Absent	31	102.629,55	86.604,89	0.153
Present	3	206.934,00	130.953,81	
PD ^b				
Absent	15	127.764,00	97.720,71	0.267
Present	19	99.255,68	90.849,43	
Seizure frequency ^a				
Daily	2	39.312,00	3.474,72	0.268
Weekly	11	120.589,18	111.935,91	
Monthly	20	116.789,40	88.664,24	
Sporadic	1	61.425,00		
GTC frequency ^a				
None	13	131.670,00	102.336,31	0.485
Monthly	6	94.731,00	82.046,74	
Sporadic	15	101.481,47	93.066,67	
Polytherapy ^b				
No	7	90.792,00	79.242,12	0.406
Yes	27	117.287,93	97.564,58	
SSRI ^b				
No	26	112.297,63	92.342,63	0.626
Yes	8	110.322,88	104.105,40	

^aKruskal–Wallis test; ^bWilcoxon–Mann–Whitney test; GTC, generalized tonic-clonic; PD, psychiatric disorder; SE, status epilepticus; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor.

decided to analyze the density of 5-HT1AR in this region. Therefore, this is the first study measuring the density of 5-HT1AR in the hippocampus of patients referred for epilepsy surgery.

A major strength of the current study is the fact that we considered an etiologically homogeneous group of patients with HS, all with pharmacoresistant epilepsy. Our most significant finding was the presence of a correlation between a higher density of 5-HT1AR and a longer duration of epilepsy in patients with TLE-HS. This phenomenon may reflect a regulatory enhancement of endogenous serotonergic neurotransmission in response to enduring epileptiform activity.

The increase of 5-HT1AR density could be a compensatory response to a reduced 5-HT1AR activity.

ANEXO 3. ARTIGO PUBLICADO: *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY* (2017), 24(4): 602 – 608

606 N. C. FONSECA ET AL.

Figure 2 Boxplot graphic from the results described in Table 3. 5-HT₁, 5-hydroxytryptaminel. (a) Psychiatric disorder (PD) description; (b) gender; (c) febrile seizure; (d) presence of generalized tonic-clonic (GTC) seizures; (e) status epilepticus; (f) PD; (g) seizure frequency; (h) GTC frequency; (i) selective serotonin reuptake inhibitor; (j) polytherapy.

Indeed, PET receptor studies in patients with TLE demonstrated a reduction in 5-HT_{1A}R binding [11,13,27], whereas other studies suggested 5-HT hyperinnervation and increased synthesis in tissue from patients with epilepsy [28,29].

In agreement with our results, Bogaert *et al.* [30] found a late relative increase of 4-18F-fluoro-*N*-2-(1-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)ethyl-*N*-2-pyridinyl-benzamine hippocampal binding in the model of limbic epilepsy induced by kainic acid. As 4-18F-fluoro-

N-2-(1-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)ethyl-*N*-2-pyridinyl-benzamine is a 5-HT_{1A}R tracer, these findings suggest an increase of 5-HT_{1A}R induced by epilepsy.

Although some authors [31,32] postulate that 5-HT_{1A}R has a proconvulsant effect, most studies have shown the opposite [3,4,33–35]. Studies in the hippocampus of rats have demonstrated a potential serotonergic antiepileptic effect via 5-HT_{1A}R [7,36]. Kim *et al.* [37] proposed that these contradictory results are due to different 5-HT_{1A}R activation, observing

ANEXO 3. ARTIGO PUBLICADO: *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY* (2017), 24(4): 602 – 608

SEROTONIN RECEPTORS AND EPILEPSY 607

anticonvulsive effects when the post-synaptic receptor is activated and a proconvulsant effect when the pre-synaptic receptor is activated.

There are some notable findings relating to the density of 5-HT_{1A}R and epileptogenicity in mice [38,39] and humans [15,16]. When considering studies involving human tissue, we must take into account that different regions may render other results. This study differs from previous reports in several areas. It is the first study to address the human hippocampus rather than the amygdala [16] or neocortical region [15]. Furthermore, we only included patients with HS. Also, previous studies used multireceptor analysis with autoradiography as opposed to western blotting [15,16]. Therefore, caution should be exercised when comparing our results with those from previous studies because of these significant methodological differences.

Concerning psychiatric comorbidities, our sample was very heterogeneous and included patients with TLE with and without psychiatric comorbidity. Some patients had mood disorders and others had psychosis, which led to the creation of smaller subgroups. For this reason, further conclusions about the possible relationship between psychiatric disorders and the density of 5-HT_{1A}R were not possible. This represents a limitation of the current study because psychiatric disorders, especially mood disorders, represent a major concern in TLE-HS.

One must also consider that some of our patients received chronic treatment with SSRIs, which are known to affect serotonergic transmission over a wide range of both pre- and post-synaptic receptor subtypes that have a large spectrum of binding potential, which explains their proepileptic and antiepileptic effects [1,40–42]. Although the role of SSRIs is controversial, they seem to impact epileptogenesis [1,41,43]. Therefore, our results may reflect the potential impact of SSRIs.

In conclusion, we demonstrated that hippocampal 5-HT_{1A}R density is associated with epilepsy duration in patients with TLE-HS. We hypothesize that this represents a potential regulatory enhancement of endogenous serotonergic neurotransmission in response to prolonged and enduring epileptiform activity. This phenomenon, previously reported in animal studies, is now documented in the hippocampal tissue of patients with pharmacoresistant TLE-HS.

Acknowledgements

We thank Bernardo dos Santos for his statistical support. Prof. Kette D. Valente was supported by the National Council of Technological and Scientific

Development (CNPq) and Agency of the São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no financial or other conflicts of interest.

References

1. Browning RA, Wood AV, Merrill MA, Dailey JW, Jobe PC. Enhancement of the anticonvulsant effect of fluoxetine following blockade of 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Pharmacol* 1997; **336**: 1–6.
2. Statnick MA, Dailey JW, Jobe PC, Browning RA. Abnormalities in 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor binding in severe-seizure genetically epilepsy-prone rats (GEPR-9s). *Neuropharmacology* 1996; **35**: 111–118.
3. Dailey JW, Mishra PK, Ko KH, Penny JE, Jobe PC. Serotonergic abnormalities in the central nervous system of seizure-naïve genetically epilepsy-prone rats. *Life Sci* 1992; **50**: 319–326.
4. Jobe PC, Dailey JW. Genetically epilepsy-prone rats (GEPRs) in drug research. *CNS Drug Rev* 2000; **6**: 241–260.
5. Clough R, Statnick M, Maring-Smith M, et al. Fetal raphe transplants reduce seizure severity in serotonin-depleted GEPRs. *NeuroReport* 1996; **8**: 341–346.
6. Filakowski J, Gerber K, Bagdy G. A serotonin-1A receptor agonist and N-methyl-D-aspartate receptor antagonist oppose each others effects in a genetic rat epilepsy model. *Neurosci Lett* 1999; **261**: 89–92.
7. Lu KT, Gean PW. Endogenous serotonin inhibits epileptiform activity in rat hippocampal CA1 neurons via 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor activation. *Neuroscience* 1998; **86**: 729–737.
8. Wada Y, Nakamura M, Hasegawa H, Yamaguchi N. Intra-hippocampal injection of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) inhibits partial and generalized seizures induced by kindling stimulation in cats. *Neurosci Lett* 1993; **159**: 179–182.
9. Wada Y, Shimizu J, Nakamura M, Koshino Y. Role of serotonin receptor subtypes in the development of amygdaloid kindling in rats. *Brain Res* 1997; **747**: 338–342.
10. Martinez A, Finegersh A, Cannon DM, et al. The 5-HT_{1A} receptor and 5-HT transporter in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2013; **80**: 1465–1471.
11. Assem-Hilger E, Lanzemberger R, Savli M, et al. Central serotonin 1A receptor binding in temporal lobe epilepsy: a [¹⁸F]WAY-100635 PET study. *Epilepsy Behav* 2010; **19**: 467–473.
12. Didelet A, Ryvlin P, Lothe A, et al. PET imaging of brain 5-HT_{1A} receptors in the preoperative evaluation of temporal lobe epilepsy. *Brain* 2008; **131**: 2751–2764.
13. Giovannini G, Toczek MT, Bonwetsch R, et al. 5-HT_{1A} receptors are reduced in temporal lobe epilepsy after partial-volume correction. *J Nucl Med* 2005; **46**: 1128–1135.
14. Blumcke I, Coras R, Myata H, Ozkara C. Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Pathol* 2012; **22**: 402–411.

ANEXO 3. ARTIGO PUBLICADO: *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY* (2017), 24(4): 602 - 608

608 N. C. FONSECA ET AL.

15. Palomero-Gallagher N, Schleicher A, Bidmon HJ, et al. Multireceptor analysis in human neocortex reveals complex alterations of receptor ligand binding in focal epilepsies. *Epilepsia* 2012; **53**: 1987–1997.
16. Graebnitz S, Kato O, Speckmann EJ, et al. Interictal-like network activity and receptor expression in the epileptic human lateral amygdala. *Brain* 2011; **134**: 2929–2947.
17. Yang Z, Liu X, Yin Y, Sun S, Deng X. Involvement of 5-HT₇ receptors in the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Eur J Pharmacol* 2012; **685**: 52–58.
18. da Fonseca NC, Joaquim HP, Talib LL, et al. Hippocampal serotonin depletion is related to the presence of generalized tonic-clonic seizures, but not to psychiatric disorders in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2015; **111**: 18–25.
19. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc task force of the ILAE commission on therapeutic strategies. *Epilepsia* 2010; **51**: 1069–1077.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265–275.
21. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 2012; **4**: 429–434.
22. Marinova Z, Monoranu CM, Fetz S, Walitza S, Grünblatt E. Region-specific regulation of the serotonin 2A receptor expression in development and ageing in post mortem human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2015; **41**: 520–532.
23. Rocha L, Lorigados-Pedre L, Orozco-Suárez S, et al. Autoradiography reveals selective changes in serotonin binding in neocortex of patients with temporal lobe epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; **31**: 1208–1218.
24. Wang L, Lv Y, Deng W, et al. 5-HT₆ receptor recruitment of mTOR modulates seizure activity in epilepsy. *Mol Neurobiol* 2015; **51**: 1292–1299.
25. Jiang X, Xing G, Yang C, et al. Stress impairs 5-HT_{2A} receptor-mediated serotonergic facilitation of GABA release in juvenile rat basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* 2009; **34**: 410–423.
26. Speranza L, Chambery A, Di Domenico M, et al. The serotonin receptor 7 promotes neurite outgrowth via ERK and Cdk5 signaling pathways. *Neuropharmacology* 2013; **67**: 155–167.
27. Liew CJ, Lim YM, Bonwetsch R, et al. 18F-FCWAY and 18F-FDG PET in MRI-negative temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2009; **50**: 234–239.
28. Chugani DC, Chugani HT, Muzik O, et al. Imaging epileptogenic tubers in children with tuberous sclerosis complex using alpha-[11C]methyl-L-tryptophan positron emission tomography. *Ann Neurol* 1998; **44**: 858–866.
29. Trottier S, Eward B, Vignal JP, Scarabin JM, Chauvel P. The serotonergic innervation of the cerebral cortex in man and its changes in focal cortical dysplasia. *Epilepsy Res* 1996; **25**: 79–106.
30. Bogaert PV, Tiège XD, Vanderwinden JM, et al. Comparative study of hippocampal neuronal loss and in vivo binding of 5-HT_{1A} receptors in the KA model of limbic epilepsy in the rat. *Epilepsy Res* 2001; **47**: 127–139.
31. Gerber K, Filakowsky J, Halasz P, Bagdy G. The 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT increases the number of spike-wave discharges in a genetic rat model of absence epilepsy. *Brain Res* 1998; **807**: 243–245.
32. Jakus R, Graf M, Juhász G, et al. 5-HT_{2C} receptors inhibit and 5-HT_{1A} receptors activate the generation of spike-wave discharges in a genetic rat model of absence epilepsy. *Exp Neurol* 2003; **184**: 964–972.
33. Dailey JW, Reigel CE, Mishra PK, Jobe PC. Neurobiology of seizure predisposition in the genetically epilepsy-prone rat. *Epilepsy Res* 1989; **3**: 3–17.
34. Perićić D, Lazić J, Jazvinčak Jembrek M, Svob Strac D. Stimulation of 5-HT 1A receptors increases the seizure threshold for picrotoxin in mice. *Eur J Pharmacol* 2005; **527**: 105–110.
35. Watanabe K, Ashby CR Jr, Katsumori H, Minabe Y. The effect of the acute administration of various selective 5-HT receptor antagonists on focal hippocampal seizures in freely-moving rats. *Eur J Pharmacol* 2000; **398**: 239–246.
36. Salgado-Comissariat D, Alkadhi KA. Serotonin inhibits epileptiform discharge by activation on 5-HT_{1A} receptors in CA1 pyramidal neurons. *Neuropharmacology* 1997; **36**: 1705–1712.
37. Kim DS, Kim JE, Kwak SE, et al. Seizure activity selectively reduces 5-HT_{1A} receptor immunoreactivity in CA1 interneurons in the hippocampus of seizure-prone gerbils. *Brain Res* 2007; **1154**: 181–193.
38. Garibokli M, Tutka P, Samanin R, Vezzani A. Stimulation of 5-HT 1A receptors in the dorsal hippocampus and inhibition of seizures induced by kainic acid in rats. *Br J Pharmacol* 1996; **119**: 813–818.
39. López-Meraz ML, González-Trujano ME, Neri-Bazán L, Hong E, Rocha LL. 5-HT_{1A} receptor agonists modify epileptic seizures in three experimental models in rats. *Neuropharmacology* 2005; **49**: 367–375.
40. Smolders I, Clinckers R, Meurs A, et al. Direct enhancement of hippocampal dopamine or serotonin levels as a pharmacodynamic measure of combined antidepressant-anticonvulsant action. *Neuropharmacology* 2008; **54**: 1017–1028.
41. Vermoesen K, Massie A, Smolders I, Clinckers R. The antidepressants citalopram and reboxetine reduce seizure frequency in rats with chronic epilepsy. *Epilepsia* 2012; **53**: 870–878.
42. Clinckers R, Smolders I, Meurs A, Ebinger G, Michotte Y. Anticonvulsant action of hippocampal dopamine and serotonin is independently mediated by D and 5-HT receptors. *J Neurochem* 2004; **89**: 834–843.
43. Yan QS, Jobe PC, Dailey JW. Evidence that a serotonergic mechanism is involved in the anticonvulsant effect of fluoxetine in genetically epilepsy-prone rats. *Eur J Pharmacol* 1994; **252**: 105–112.

ANEXO 4 -TABELA CARACTERIZAÇÃO PACIENTES – 5-HT1A

Paciente	Sexo	Idade na cirurgia (anos)	Idade início epilepsia (anos)	Duração da epilepsia (anos)	Frequência das crises	História de crises febris	História de CTCG	Frequência CTCG	História de EME	FAEs	SRS/ Antipsicóticos	TP
4	Fe	40	5	35	Me	-	+	E	-	LMT/TPM/PB	-	De
5	Fe	35	12	23	Me	-	+	E	-	CBZ/LMT/PB	-	De
6	Fe	39	9	30	Me	-	+	E	-	CBZ/PHT	-	De
7	M	29	16	13	S	+	+	E	-	CBZ/VPA/PB/BZD	SER/RISP	De
9	Fe	45	10	35	S	-	+	E	-	OKC/PB	-	A
10	M	37	20	17	Me	-	+	E	-	CBZ	-	P
11	M	27	5	22	Me	+	+	E	-	VPA/PB	-	P
12	Fe	43	8	35	Me	-	+	E	-	CBZ/PB	HAL	P
13	Fe	41	18	23	D	-	+	Me	-	PHT/BZD	-	P
14	Fe	45	1	44	Me	-	+	E	-	PHT/LMT/BZD	RISP	P
15	M	44	21	23	S	-	+	E	-	CBZ/BZD	RISP	P
17	M	35	9	26	D	-	+	E	-	CBZ/BZD	-	P
18	M	22	1	21	S	-	+	E	+	CBZ/PB/BZD	-	N
20	M	10	0,75	10	S	-	+	Me	-	CBZ	RISP	N
21	Fe	44	29	15	Me	-	+	Me	-	CBZ	-	N
22	M	24	0,4	24	Me	-	+	Me	+	CBZ	-	N
24	Fe	51	8	43	S	+	+	E	-	PHT/TPM/PB/BZD	-	N
25	Fe	38	0,75	37	Me	+	+	Me	-	CBZ/BZD	-	N
27	M	42	1	41	Me	-	+	E	+	OKC/LMT/BZD	-	N
28	M	47	12	35	Me	-	+	Me	-	CBZ/PB	-	N
29	Fe	33	21	12	S	-	+	E	-	CBZ/BZD	-	N
30	Fe	41	14	27	S	-	-	-	-	PHT/TPM/PB	SER	De
31	M	15	3	12	S	+	-	-	-	CBZ	SER	De
32	Fe	34	11	23	S	-	-	-	-	CBZ/VPA	SER	De
33	Fe	43	12	29	Me	+	-	-	-	CBZ/PB/BZD	SER	De
34	Fe	37	21	16	Me	-	-	-	-	CBZ/BZD	FLX	De
35	Fe	41	14	27	S	-	-	-	-	CBZ/LMT/BZD	FLX	De
36	M	17	1	16	Me	-	-	-	-	CBZ/TPM/BZD	SER/RISP/HAL	De
37	Fe	69	9	60	Me	-	-	-	-	CBZ/PB	-	N
39	Fe	13	5	8	Me	-	-	-	-	CBZ	-	N
41	M	20	10	10	S	-	-	-	-	CBZ/PB	-	N
42	M	29	5	24	Me	-	-	-	-	CBZ/VPA/BZD	-	N
43	M	50	16	34	Me	-	-	-	-	CBZ/LMT/PB/PHT	-	N
44	M	18	1	17	Me	-	-	-	-	CBZ	-	N

ANEXO 5. TABELA CARACTERIZAÇÃO PACIENTES – 5-HT2A

Paciente	Sexo	Idade na cirurgia (anos)	Idade início epilepsia (anos)	Duração da epilepsia (anos)	Frequência das crises	História de crises febris	História de CTCG	Frequência CTCG	História de EME	FAEs	ISRS/ Antipsicóticos	TP
1	Fe	13	5	7	S	+	+	E	-	OXC/BZD	-	De
4	Fe	40	5	35	Me	-	+	E	-	LMT/TPM/PB	-	De
5	Fe	35	12	23	Me	-	+	E	-	CBZ/LMT/PB	-	De
9	Fe	45	10	35	S	-	+	E	-	OXC/PB	-	A
10	M	37	20	17	Me	-	+	E	-	CBZ	-	P
11	M	27	5	22	Me	+	+	E	-	VPA/PB	-	P
12	Fe	43	8	35	Me	-	+	E	-	CBZ/PB	HAL	P
13	Fe	41	18	23	D	-	+	Me	-	PHT/BZD	-	P
14	Fe	45	1	44	Me	-	+	E	-	PHT/LMT/BZD	RISP	P
17	M	35	9	26	D	-	+	E	-	CBZ/BZD	-	P
18	M	22	1	21	S	-	+	E	+	CBZ/PB/BZD	-	N
20	M	10	0.75	10	S	-	+	Me	-	CBZ	RISP	N
22	M	24	0.4	24	Me	-	+	Me	+	CBZ	-	N
24	Fe	51	8	43	S	+	+	E	-	PHT/TPM/PB/BZD	-	N
25	Fe	38	0.75	37	Me	+	+	Me	-	CBZ/BZD	-	N
27	M	42	1	41	Me	-	+	E	+	OXC/LMT/BZD	-	N
28	M	47	12	35	Me	-	+	Me	-	CBZ/PB	-	N
29	Fe	33	21	12	S	-	+	E	-	CBZ/BZD	-	N
30	Fe	41	14	27	S	-	-	-	-	PHT/TPM/PB	SER	De
31	M	15	3	12	S	+	-	-	-	CBZ	SER	De
32	Fe	34	11	23	S	-	-	-	-	CBZ/VPA	SER	De
33	Fe	43	12	29	Me	+	-	-	-	CBZ/PB/BZD	SER	De
34	Fe	37	21	16	Me	-	-	-	-	CBZ/BZD	FLX	De
35	Fe	41	14	27	S	-	-	-	-	CBZ/LMT/BZD	FLX	De
36	M	17	1	16	Me	-	-	-	-	CBZ/TPM/BZD	SER/RISP/HAL	De
39	Fe	13	5	8	Me	-	-	-	-	CBZ	-	N
41	M	20	10	10	S	-	-	-	-	CBZ/PB	-	N
42	M	29	5	24	Me	-	-	-	-	CBZ/VPA/BZD	-	N
43	M	50	16	34	Me	-	-	-	-	CBZ/LMT/PB/PHT	-	N
44	M	18	1	17	Me	-	-	-	-	CBZ	-	N

ANEXO 6. TABELA CARACTERIZAÇÃO PACIENTES – 5-HT6

Paciente	Sexo	Idade na cirurgia (anos)	Idade início epilepsia (anos)	Duração da epilepsia (anos)	Frequência das crises	História de crises febris	História de CTCG	Frequência CTCG	História de EME
4	Fe	40	5	35	Me	-	+	E	-
5	Fe	35	12	23	Me	-	+	E	-
9	Fe	45	10	35	S	-	+	E	-
13	Fe	41	18	23	D	-	+	Me	-
14	Fe	45	1	44	Me	-	+	E	-
18	M	22	1	21	S	-	+	E	+
20	M	10	0.75	10	S	-	+	Me	-
24	Fe	51	8	43	S	+	+	E	-
25	Fe	38	0.75	37	Me	+	+	Me	-
27	M	42	1	41	Me	-	+	E	+
31	M	15	3	12	S	+	-	-	-
32	Fe	34	11	23	S	-	-	-	-
34	Fe	37	21	16	Me	-	-	-	-
39	Fe	13	5	8	Me	-	-	-	-
43	M	50	16	34	Me	-	-	-	-

ANEXO 7 - TABELA CARACTERIZAÇÃO PACIENTES – 5-HT7

Paciente	Sexo	Idade na cirurgia (anos)	Idade início epilepsia (anos)	Duração da epilepsia (anos)	Frequência das crises	História de crises febris	História de CTCG	Frequência CTCG	História de EME	FAEs	ISRS/ Antipsicóticos	TP
4	Fe	40	5	35	Me	-	+	E	-	LMT/TPM/PB	-	De
5	Fe	35	12	23	Me	-	+	E	-	CBZ/LMT/PB	-	De
6	Fe	39	9	30	Me	-	+	E	-	CBZ/PHT	-	De
9	Fe	45	10	35	S	-	+	E	-	OXC/PB	-	A
10	M	37	20	17	Me	-	+	E	-	CBZ	-	P
11	M	27	5	22	Me	+	+	E	-	VPA/PB	-	P
12	Fe	43	8	35	Me	-	+	E	-	CBZ/PB	HAL	P
13	Fe	41	18	23	D	-	+	Me	-	PHT/BZD	-	P
14	Fe	45	1	44	Me	-	+	E	-	PHT/LMT/BZD	RISP	P
15	M	44	21	23	S	-	+	E	-	CBZ/BZD	RISP	P
17	M	35	9	26	D	-	+	E	-	CBZ/BZD	-	P
20	M	10	0.75	10	S	-	+	Me	-	CBZ	RISP	N
21	Fe	44	29	15	Me	-	+	Me	-	CBZ	-	N
22	M	24	0.4	24	Me	-	+	Me	+	CBZ	-	N
24	Fe	51	8	43	S	+	+	E	-	PHT/TPM/PB/BZD	-	N
25	Fe	38	0.75	37	Me	+	+	Me	-	CBZ/BZD	-	N
27	M	42	1	41	Me	-	+	E	+	OXC/LMT/BZD	-	N
28	M	47	12	35	Me	-	+	Me	-	CBZ/PB	-	N
29	Fe	33	21	12	S	-	+	E	-	CBZ/BZD	-	N
30	Fe	41	14	27	S	-	-	-	-	PHT/TPM/PB	SER	De
31	M	15	3	12	S	+	-	-	-	CBZ	SER	De
32	Fe	34	11	23	S	-	-	-	-	CBZ/VPA	SER	De
33	Fe	43	12	29	Me	+	-	-	-	CBZ/PB/BZD	SER	De
34	Fe	37	21	16	Me	-	-	-	-	CBZ/BZD	FLX	De
35	Fe	41	14	27	S	-	-	-	-	CBZ/LMT/BZD	FLX	De
36	M	17	1	16	Me	-	-	-	-	CBZ/TPM/BZD	SER/RISP/HAL	De
37	Fe	69	9	60	Me	-	-	-	-	CBZ/PB	-	N
39	Fe	13	5	8	Me	-	-	-	-	CBZ	-	N
41	M	20	10	10	S	-	-	-	-	CBZ/PB	-	N
42	M	29	5	24	Me	-	-	-	-	CBZ/VPA/BZD	-	N
43	M	50	16	34	Me	-	-	-	-	CBZ/LMT/PB/PHT	-	N

ANEXO 8- TABELA CARACTERIZAÇÃO PACIENTES – 5-HTT

<i>Paciente</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade na cirurgia (anos)</i>	<i>Idade início epilepsia (anos)</i>	<i>Duração da epilepsia (anos)</i>	<i>Frequência das crises</i>	<i>História de crises febris</i>	<i>História de CTCG</i>	<i>Frequência CTCG</i>	<i>História de EME</i>
4	Fe	40	5	35	Me	-	+	E	-
5	Fe	35	12	23	Me	-	+	E	-
6	Fe	39	9	30	Me	-	+	E	-
7	M	29	16	13	S	+	+	E	-
9	Fe	45	10	35	S	-	+	E	-
10	M	37	20	17	Me	-	+	E	-
12	Fe	43	8	35	Me	-	+	E	-
13	Fe	41	18	23	D	-	+	Me	-
14	Fe	45	1	44	Me	-	+	E	-
18	M	22	1	21	S	-	+	E	+
20	M	10	0.75	10	S	-	+	Me	-
21	Fe	44	29	15	Me	-	+	Me	-
24	Fe	51	8	43	S	+	+	E	-
25	Fe	38	0.75	37	Me	+	+	Me	-
27	M	42	1	41	Me	-	+	E	+
30	Fe	41	14	27	S	-	-	-	-
31	M	15	3	12	S	+	-	-	-
32	Fe	34	11	23	S	-	-	-	-
34	Fe	37	21	16	Me	-	-	-	-
37	Fe	69	9	60	Me	-	-	-	-
39	Fe	13	5	8	Me	-	-	-	-
42	M	29	5	24	Me	-	-	-	-
43	M	50	16	34	Me	-	-	-	-
44	M	18	1	17	Me	-	-	-	-

ANEXO 9 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

● ANÁLISE ESTATÍSTICA 5-HT

5HT * PD			
5HT			
PD	N	Mean	Std. Deviation
None	20	,307252	,1362377
Present	24	,361104	,1918593
Total	44	,336626	,1691923
5HT * Psychiatric Disorder Descriptive			
5HT			
Psychiatric Disorder	N	Mean	Std. Deviation
None	20	,307252	,1362377
Mood Disorders	16	,343531	,1770436
Psychosis	8	,396250	,2272946
Total	44	,336626	,1691923
5HT * Seizure frequency			
5HT			
Seizure frequency	N	Mean	Std. Deviation
Daily	5	,392758	,1900508
Weekly	16	,290930	,1886230
Monthly	22	,361421	,1513500
Esporadic	1	,241600	.
Total	44	,336626	,1691923
5HT * GTC frequency			
5HT			
GTC frequency	N	Mean	Std. Deviation
None	15	,408432	,1612798
Monthly	10	,275160	,0888362
Esporadic	19	,312287	,1928383
Total	44	,336626	,1691923
5HT * SE			
5HT			
SE	N	Mean	Std. Deviation
None	38	,339978	,1717266
Present	6	,315392	,1653218
Total	44	,336626	,1691923
5HT * Febrile Seizure			
5HT			
Febrile Seizure	N	Mean	Std. Deviation
None	35	,355014	,1747565
Present	9	,265117	,1297636
Total	44	,336626	,1691923

	N	5HT Mean	SD	p-value
PD ¹				0,334
None	20	0,31	0,14	
Present	24	0,36	0,19	
Psychiatric Disorder Descriptive ²				0,549
None	20	0,31	0,14	
Mood Disorders	16	0,34	0,18	
Psychosis	8	0,40	0,23	
Seizure frequency ²				0,211
Daily	5	0,39	0,19	
Weekly	16	0,29	0,19	
Monthly	22	0,36	0,15	
Esporadic	1	0,24	.	
SE ¹				0,657
None	38	0,34	0,17	
Present	6	0,32	0,17	
GTC seizures ¹				0,019
None	15	0,41	0,16	
Present	29	0,30	0,16	
GTC frequency ²				0,065
None	15	0,41	0,16	
Monthly	10	0,28	0,09	
Esporadic	19	0,31	0,19	
Febrile Seizure ¹				0,250
None	35	0,36	0,17	
Present	9	0,27	0,13	
Monotherapy ¹				0,179
No	34	0,32	0,17	
Yes	10	0,38	0,16	
Polytherapy ¹				0,302
No	9	0,38	0,17	
Yes	35	0,33	0,17	

¹Wilcoxon-Mann-Whitney test; ²Kruskal-Wallis test

Nonparametric Correlations

[DataSet1] C:\Users\5465526\Dropbox\Estatística\IPq\Kette_Valente\Natascha\Banco_serotonina.sav

Correlations					
			5HT	Age of onset of epilepsy (yrs)	Duration of epilepsy (yrs)
Spearman's rho	5HT	Correlation Coefficient	1,000	-,012	-,051
		Sig. (2-tailed)	.	,938	,745
		N	44	44	44
	Age of onset of epilepsy (yrs)	Correlation Coefficient	-,012	1,000	-,091
		Sig. (2-tailed)	,938	.	,558
		N	44	44	44
	Duration of epilepsy (yrs)	Correlation Coefficient	-,051	-,091	1,000
		Sig. (2-tailed)	,745	,558	.
		N	44	44	44

	5HT	
	Corr.	p-value
Age of onset of epilepsy (yrs)	-0,012	0,938
Duration of epilepsy (yrs)	-0,051	0,745
Spearman coefficient		

● GENERALIZED LINEAR MODELS 5-HT X FATORES CONFUSIONAIS

Model Information

Dependent Variable	5HT
Probability Distribution	Gamma
Link Function	Log

Omnibus Test^a

Likelihood Ratio Chi-Square	df	Sig.
10,541	3	,014

Dependent Variable: 5HT

Model: (Intercept), GTCseizures, ISRS, GTCseizures * ISRS

Compares the fitted model against the intercept-only model.

Tests of Model Effects

Type III			
Source	Wald Chi-Square	df	Sig.
(Intercept)	150,018	1	,000
GTCseizures	9,019	1	,003
ISRS	,321	1	,571
GTCseizures * ISRS	7,159	1	,007

Dependent Variable: 5HT

Model: (Intercept), GTCseizures, ISRS, GTCseizures * ISRS

Estimated Marginal Means: GTC seizures* ISRS							
Pairwise Comparisons							
(I) GTCseizures*ISRS	(J) GTCseizures*ISRS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	df	Sig.	95% Wald Confidence Interval for Difference	
						Lower	Upper
[GTCseizures=0]*[ISRS=0]	[GTCseizures=0]*[ISRS=1]	-,168184	,0964379	1	,081	-,357199	,020831
	[GTCseizures=1]*[ISRS=0]	,020448	,0570307	1	,720	-,091330	,132226
	[GTCseizures=1]*[ISRS=1]	,165646 ^a	,0716853	1	,021	,025146	,306147
[GTCseizures=0]*[ISRS=1]	[GTCseizures=0]*[ISRS=0]	,168184	,0964379	1	,081	-,020831	,357199
	[GTCseizures=1]*[ISRS=0]	,188632 ^a	,0859824	1	,028	,020109	,357154
	[GTCseizures=1]*[ISRS=1]	,333830 ^a	,0963289	1	,001	,145029	,522631
[GTCseizures=1]*[ISRS=0]	[GTCseizures=0]*[ISRS=0]	-,020448	,0570307	1	,720	-,132226	,091330
	[GTCseizures=0]*[ISRS=1]	-,188632 ^a	,0859824	1	,028	-,357154	-,020109
	[GTCseizures=1]*[ISRS=1]	,145198 ^a	,0568462	1	,011	,033782	,256615
[GTCseizures=1]*[ISRS=1]	[GTCseizures=0]*[ISRS=0]	-,165646 ^a	,0716853	1	,021	-,306147	-,025146
	[GTCseizures=0]*[ISRS=1]	-,333830 ^a	,0963289	1	,001	-,522631	-,145029
	[GTCseizures=1]*[ISRS=0]	-,145198 ^a	,0568462	1	,011	-,256615	-,033782

Pairwise comparisons of estimated marginal means based on the original scale of dependent variable 5HT

a. The mean difference is significant at the .05 level.

MEANS

Report				
5HT				
GTC seizures	ISRS	N	Mean	Std. Deviation
None	0	8	,329946	,1430713
	1	7	,498130	,1386063
	Total	15	,408432	,1612798
Present	0	27	,309498	,1649709
	1	2	,164300	,0505864
	Total	29	,299484	,1635998
Total	0	35	,314172	,1584360
	1	9	,423946	,1907827
	Total	44	,336626	,1691923

MEANS

5HT			
GTC frequency	N	Mean	Std. Deviation
None	15	,408432	,1612798
Monthly	10	,275160	,0888362
Esporadic	19	,312287	,1928383
Total	44	,336626	,1691923

● ANÁLISE 5-HT1A E 5-HT2A

		5HT1			5HT2A	
		Valid N	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
0						
PD Descriptive	None	15	131.913,60	96.990,13	134.228,57	100.340,59
	Mood disorders	12	120.709,33	106.286,67	174.512,89	116.919,12
	Psychosis	7	53.586,00	19.836,36	116.496,00	106.021,52
Gender	Female	18	127.582,00	100.662,97	142.954,13	106.858,64
	Male	16	94.115,13	84.585,08	143.177,14	107.709,27
Febrile Seizure	Absent	28	122.060,25	99.315,35	147.414,33	107.400,20
	Present	6	64.105,17	35.089,77	122.169,60	103.371,02
GTC seizures presence	Absent	13	131.670,00	102.336,31	150.972,67	111.915,16
	Present	21	99.552,76	88.066,25	137.477,65	103.568,74
SE	Absent	31	102.629,55	86.604,89	133.914,77	98.200,86
	Present	3	206.934,00	130.953,81	222.336,00	155.830,09
PD	Absent	15	127.764,00	97.720,71	129.533,54	102.824,75
	Present	19	99.255,68	90.849,43	154.053,50	109.389,96
Seizure frequency	Daily	2	39.312,00	3.474,72	165.024,00	182.060,20
	Weekly	11	120.589,18	111.935,91	181.424,89	129.489,49
	Monthly	20	116.789,40	88.664,24	124.568,47	85.795,37
	Esporadic	1	61.425,00		68.256,00	
GTC frequency	None	13	131.670,00	102.336,31	150.972,67	111.915,16
	Daily	0				
	Weekly	0				
	Monthly	6	94.731,00	82.046,74	186.624,00	110.077,80
	Esporadic	15	101.481,47	93.066,67	117.000,00	98.186,47
	No GTC seizure	0				
SSRI	No	26	112.297,50	92.342,63	132.113,45	96.006,03
	Yes	8	110.322,88	104.105,40	177.470,86	133.037,96
Antipsychotic	No	26	129.874,50	100.096,46	140.488,00	109.173,02
	Yes	8	53.197,63	19.339,65	152.928,00	97.704,61
Polytherapy	No	7	90.792,00	79.242,12	169.344,00	116.055,50
	Yes	27	117.287,93	97.564,58	136.205,57	104.034,47
Psychotropic	No	20	127.968,75	99.958,23	136.613,65	100.947,54
	Yes	14	88.781,64	81.609,18	152.196,67	115.177,79

	N	5HT1			5HT2A		
		Mean	SD	p-value	Mean	SD	p-value
PD Descriptive				0,177			0,440
None	15	131.913,60	96.990,13		134.228,57	100.340,59	
Mood disorders	12	120.709,33	106.286,67		174.512,89	116.919,12	
Psychosis	7	53.586,00	19.836,36		116.496,00	106.021,52	
Gender				0,152			0,861
Female	18	127.582,00	100.662,97		142.954,13	106.858,64	
Male	16	94.115,13	84.585,08		143.177,14	107.709,27	
Febrile Seizure				0,258			0,908
Absent	28	122.060,25	99.315,35		147.414,33	107.400,20	
Present	6	64.105,17	35.089,77		122.169,60	103.371,02	
GTC seizures presence				0,321			0,723
Absent	13	131.670,00	102.336,31		150.972,67	111.915,16	
Present	21	99.552,76	88.066,25		137.477,65	103.568,74	
SE				0,153			0,252
Absent	31	102.629,55	86.604,89		133.914,77	98.200,86	
Present	3	206.934,00	130.953,81		222.336,00	155.830,09	
PD				0,267			0,614
Absent	15	127.764,00	97.720,71		129.533,54	102.824,75	
Present	19	99.255,68	90.849,43		154.053,50	109.389,96	
Seizure frequency				0,268			0,761
Daily	2	39.312,00	3.474,72		165.024,00	182.060,20	
Weekly	11	120.589,18	111.935,91		181.424,89	129.489,49	
Monthly	20	116.789,40	88.664,24		124.568,47	85.795,37	
Esporadic	1	61.425,00			68.256,00		
GTC frequency				0,485			0,452
None	13	131.670,00	102.336,31		150.972,67	111.915,16	
Monthly	6	94.731,00	82.046,74		186.624,00	110.077,80	
Esporadic	15	101.481,47	93.066,67		117.000,00	98.186,47	
SSRI				0,626			0,400
No	26	112.297,50	92.342,63		132.113,45	96.006,08	
Yes	8	110.322,88	104.105,40		177.470,86	133.037,96	
Antipsychotic				0,028			0,590
No	26	129.874,50	100.096,46		140.488,00	109.173,02	
Yes	8	53.197,63	19.339,65		152.928,00	97.704,61	
Polytherapy				0,406			0,686
No	7	90.792,00	79.242,12		169.344,00	116.055,50	
Yes	27	117.287,93	97.564,58		136.205,57	104.034,47	
Psychotropic				0,234			0,707
No	20	127.968,75	99.958,23		136.613,65	100.947,54	
Yes	14	88.781,64	81.609,18		152.196,67	115.177,79	

*Wilcoxon-Mann-Whitney test; *Kruskal-Wallis test

Nonparametric Correlations									
Correlations									
Spearman's rho									
	5HT1			5HT2A			5HT		
	N	Correlation Coefficient	Sig. (2-tailed)	N	Correlation Coefficient	Sig. (2-tailed)	N	Correlation Coefficient	Sig. (2-tailed)
5HT1	34	1,000		29	0,484	0,008	34	-0,080	0,655
5HT2A	29	0,484	0,008	29	1,000		29	-0,319	0,092
5HT	34	-0,080	0,655	29	-0,319	0,092	34	1,000	
Age at surgery (yrs)	34	0,166	0,347	29	-0,109	0,574	34	-0,206	0,241
Age of onset of epilepsy (yrs)	34	-0,197	0,265	29	-0,175	0,363	34	-0,081	0,648
Duration of epilepsy (yrs)	34	0,354	0,040	29	-0,069	0,724	34	-0,027	0,879

	5HT1		5HT2A	
	Correlation	p-value	Correlation	p-value
5HT2A	0,484	0,008		
5HT	-0,080	0,655	-0,319	0,092
Age at surgery (yrs)	0,166	0,347	-0,109	0,574
Age of onset of epilepsy (yrs)	-0,197	0,265	-0,175	0,363
Duration of epilepsy (yrs)	0,354	0,040	-0,069	0,724

Spearman coefficient

Model Information			
Dependent Variable	5HT1		
Probability Distribution	Gamma		
Link Function	Log		
Goodness of Fit^a			
	Value	df	Value/df
Deviance	13,277	31	0,428
Scaled Deviance	36,060	31	
Pearson Chi-Square	13,961	31	0,450
Scaled Pearson Chi-Square	37,917	31	
Log Likelihood ^b	-418,901		
Akaike's Information Criterion (AIC)	845,802		
Finite Sample Corrected AIC (AICC)	847,182		
Bayesian Information Criterion (BIC)	851,908		
Consistent AIC (CAIC)	855,908		
Dependent Variable: 5HT1			
a. Information criteria are in smaller-is-better form.			
b. The full log likelihood function is displayed and used in computing information criteria.			
Omnibus Test^a			
Likelihood Ratio Chi-Square	df	Sig.	
13,705	2	0,001	
Dependent Variable: 5HT1			
Model: (Intercept), Antipsychotic, Duration			
a. Compares the fitted model against the intercept-only model.			
Tests of Model Effects			
	Type III		
Source	Likelihood Ratio Chi-Square	df	Sig.
(Intercept)	182,180	1	0,000
Antipsychotic	8,874	1	0,003
Duration	4,956	1	0,026
Dependent Variable: 5HT1			
Model: (Intercept), Antipsychotic, Duration			

Parameter Estimates											
Parameter	B	Std. Error	Interval		Hypothesis Test			Exp(B)	Confidence Interval for		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	df	Sig.		Lower	Upper	
(Intercept)	11,196	0,2767	10,642	11,756	1636,789	1	0,000	72839,959	41872,489	#####	
Antipsychotic	-0,842	0,2464	-1,319	-0,323	11,692	1	0,001	0,431	0,267	0,724	
Duration	0,021	0,0096	0,003	0,041	4,837	1	0,026	1,021	1,003	1,042	
(Scale)	,368 ^a	0,0844	0,242	0,595							

Dependent Variable: SHT1
Model: (Intercept), Antipsychotic, Duration

a. Maximum likelihood estimate.

● ANÁLISE ESTATÍSTICA 5-HT7

		5HT7		
		Valid N	Mean	Standard Deviation
Gender	Female	18	120874	83590
	Male	13	117098	95466
Seizure frequency	0	1	109475	
	Daily	1	200100	
	Weekly	9	148867	92179
	Monthly	19	105877	86791
	Sporadic	1	36975	
GTC presence	None	12	94594	83473
	Present	19	134888	88088
GTC frequency	None	12	94594	83473
	Daily	0		
	Weekly	0		
	Monthly	6	100050	81528
	Sporadic	13	150967	89347
SE	None	29	121242	88552
	Present	2	90988	83562
Febrile Seizure	None	26	127006	87894
	Present	5	79170	79887
Presence Psychiatric Disorder	None	13	120015	81531
	Present	18	118767	93456
PSYCHOTROPIC	None	18	124700	86569
	Present	13	111800	91104
SSRI	None	24	129080	86749
	Present	7	85726	86590
Antipsychotic	None	24	118326	85385
	Present	7	122597	100395
Type of Psychiatric Disorder	None	13	120015	81531
	Mood disorders	11	89946	84903
	Psychosis	7	164057	93895
Polytherapy	None	7	111132	95226
	Present	24	121670	86790

5HT7 * Seizure frequency			
5HT7			
Seizure frequency	N	Mean	Std. Deviation
Daily	2	154787,50	64081,552
Weekly	9	148866,67	92179,124
Monthly	19	105876,58	86790,879
Sporadic	1	36975,00	
Total	31	119290,48	87227,211

5HT7				
	N	Mean	SD	p-value
Seizure frequency				0,066 ²
Daily	2	154788	64082	
Weekly	9	148867	92179	
Monthly	19	105877	86791	
Sporadic	1	36975		

²Kruskal-Wallis Test

	5HT7			P-value
	N	Mean	SD	
Gender				0,562 ¹
Female	18	120874	83590	
Male	13	117098	95466	
Seizure frequency				0,057 ⁸
Daily	1	200100		
Weekly	9	148867	92179	
Monthly	19	105877	86791	
Sporadic	1	36975		
GTC presence				0,320 ¹
None	12	94594	83473	
Present	19	134888	88088	
GTC frequency				0,136 ⁸
None	12	94594	83473	
Monthly	6	100050	81528	
Sporadic	13	150967	89347	
SE				0,469 ¹
None	29	121242	88552	
Present	2	90988	83562	
Febrile Seizure				0,133 ¹
None	26	127006	87894	
Present	5	79170	79887	
Presence Psychiatric Disorder				0,857 ¹
None	13	120015	81531	
Present	18	118767	93456	
PSYCHOTROPIC				0,873 ¹
None	18	124700	86569	
Present	13	111800	91104	
SSRI				0,333 ¹
None	24	129080	86749	
Present	7	85726	86590	
Antipsychotic				0,943 ¹
None	24	118326	85385	
Present	7	122597	100395	
Type of Psychiatric Disorder				0,306 ²
None	13	120015	81531	
Mood disorders	11	89946	84903	
Psychosis	7	164057	93895	
Polytherapy				0,464 ¹
None	7	111132	95226	
Present	24	121670	86790	

¹Wilcoxon-Mann-Whitney teste, ²Kruskal-Wallis test, ³Jonckheere-Terpstra test

Nonparametric Correlations			
Correlations			
Spearman's rho			
5HT7			
	Correlation Coefficient	Sig. (2-tailed)	N
Age at surgery (yrs)	0,325	0,074	31
Age of onset of epilepsy (yrs)	0,334	0,067	31
Epilepsy Duration	0,144	0,439	31
5HT	0,005	0,979	31

	5HT7		
	N	Correlation	P-value
Age at surgery (yrs)	31	0,325	0,074
Age of onset of epilepsy (yrs)	31	0,334	0,067
Epilepsy Duration	31	0,144	0,439
5HT	31	0,005	0,979
Spearman correlation			

ANÁLISE ESTATÍSTICA 5-HT6 E SERT

		5HT6		
		Valid N	Mean	Standard Deviation
Sexo	Feminino	10	281450	28357
	Masculino	5	249275	62976
Crises febris	Ausente	12	268058	46934
	Presente	3	281396	30772
Crises tônico clônico generalizados	Ausente	5	286163	30565
	Presente	10	263007	48336
Estado de mal epilético	Ausente	13	284438	26052
	Presente	2	181594	8618
Transtorno Psiquiátrico	Ausente	7	249786	53979
	Presente	8	289047	21761
Tipo de TP	Nenhum	8	254516	51734
	Transtorno de humor	5	289738	22352
	Psicose	2	288032	36195
Frequência das crises	Diária	1	262438	
	Semanal	6	259323	43930
	Mensal	8	280313	46779
Frequencia CTCG	Mensal	3	283021	22063
	Esporádico	7	254429	55283
	Ausente	5	286163	30565
ISRS	Não	12	265146	46629
	Sim	3	293042	19590
Antipicóticos	Não	12	267042	47086
	Sim	3	285459	25979
Politerapia	Não	3	270292	27025
	Sim	12	270834	47759
Psicotrópicos	Não	10	258782	48225
	Sim	5	294613	18309

		SERT		
		Valid N	Mean	Standard Deviation
Sexo	Feminino	15	215930	134516
	Masculino	9	236500	146239
Crises febris	Ausente	20	227040	134273
	Presente	4	206663	166184
Crises tônico clônico generalizados	Ausente	9	203775	121866
	Presente	15	235565	146945
Estado de mal epilético	Ausente	22	210750	134627
	Presente	2	365475	47836
Transtorno Psiquiátrico	Ausente	11	227550	136832
	Presente	13	220338	141201
Tipo de TP	Nenhum	11	227625	136741
	Transtorno de humor	9	169400	139033
	Psicose	4	334744	55205
Frequência das crises	Diária	1	350625	
	Semanal	8	259875	141245
	Mensal	15	195855	133345
Frequencia CTCG	Mensal	4	215944	160800
	Esporádico	11	242700	149207
	Ausente	9	203775	121866
ISRS	Não	19	231347	137514
	Sim	5	194370	142302
Antipicóticos	Não	19	208855	135503
	Sim	5	279840	138157
Politerapia	Não	6	251350	129891
	Sim	18	214408	140648
Psicotrópicos	Não	16	212231	140006
	Sim	8	246469	134439

	SERT				5HT6			
	N	Mean	SD	p-value	N	Mean	SD	p-value
Sexo				0,551 ¹				0,462 ¹
Feminino	15	215930	134516		10	281450	28357	
Masculino	9	236500	146239		5	249275	62976	
Crises febris				0,614 ¹				0,885 ¹
Ausente	20	227040	134273		12	268058	46934	
Presente	4	206663	166184		3	281396	30772	
Crises tônico clônico generalizados				0,905 ¹				0,358 ¹
Ausente	9	203775	121866		5	286163	30565	
Presente	15	235565	146945		10	263007	48336	
Estado de mal epilético				0,174 ¹				0,027 ¹
Ausente	22	210750	134627		13	284438	26052	
Presente	2	365475	47836		2	181594	8618	
Transtorno Psiquiátrico				0,602 ¹				0,105 ¹
Ausente	11	227550	136832		7	249786	53979	
Presente	13	220338	141201		8	289047	21761	
Tipo de TP				0,128 ²				0,318 ²
Nenhum	11	227625	136741		8	254516	51734	
Transtorno de humor	9	169400	139033		5	289738	22352	
Psicose	4	334744	55205		2	288032	36195	
Frequência das crises				0,250 ³				0,176 ³
Diária	1	350625			1	262438		
Semanal	8	259875	141245		6	259323	43930	
Mensal	15	195855	133345		8	280313	46779	
Frequência CTCG				0,871 ³				0,589 ³
Mensal	4	215944	160800		3	283021	22063	
Esporádico	11	242700	149207		7	254429	55283	
Ausente	9	203775	121866		5	286163	30565	
ISRS				0,434 ¹				0,279 ¹
Não	19	231347	137514		12	265146	46629	
Sim	5	194370	142302		3	293042	19590	
Antipicóticos				0,374 ¹				0,516 ¹
Não	19	208855	135503		12	267042	47086	
Sim	5	279840	138157		3	285459	25979	
Politerapia				0,571 ¹				0,665 ¹
Não	6	251350	129891		3	270292	27025	
Sim	18	214408	140648		12	270834	47759	
Psicotrópicos				0,646 ¹				0,086 ¹
Não	16	212231	140006		10	258782	48225	
Sim	8	246469	134439		5	294613	18309	

¹Wilcoxon-Mann-Whitney Test; ²Kruskal-Wallis Test; ³Jonckheere-Terpstra Test

Nonparametric Correlations			
Correlations			
Spearman's rho			
5HT6			
	Correlation Coefficient	Sig. (2-tailed)	N
5HT	-0,066	0,815	15
Idade na cirurgia	0,169	0,547	15
Idade de início	0,273	0,325	15
Duração epilepsia (anos)	0,081	0,775	15

Nonparametric Correlations			
	Correlations		
Spearman's rho			
SERT			
	Correlation Coefficient	Sig. (2-tailed)	N
5HT	-0,087	0,688	24
Idade na cirurgia	-0,020	0,927	24
Idade de início	-0,303	0,150	24
Duração epilepsia (anos)	0,072	0,738	24

	SERT		5HT6	
	Corr.	p-value	Corr.	p-value
5HT	-0,087	0,688	-0,066	0,815
Idade na cirurgia	-0,020	0,927	0,169	0,547
Idade de início	-0,303	0,150	0,273	0,325
Duração epilepsia (anos)	0,072	0,738	0,081	0,775

Spearman coefficient

9. REFERÊNCIAS

Ablah E, Hesdorffer DC, Liu Y, Paschal AM, Hawley S, Thurman D. et al. Prevalence of epilepsy in rural Kansas. **Epilepsy Res.** 2014; 108(4):792-801. ISSN 1872-6844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24613507> >.

Alenina N, Klempin F. The role of serotonin in adult hippocampal neurogenesis. **Behav Brain Res.** 2015; 277:49-57. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25125239> >.

Alvarez JC, Bothua D, Collignon I, Advenier C, Spreux-Varoquaux O. Simultaneous measurement of dopamine, serotonin, their metabolites and tryptophan in mouse brain homogenates by high-performance liquid chromatography with dual coulometric detection. **Biomed Chromatogr.** 1999;13(4):293-8.. ISSN 0269-3879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10416063> >.

Andrade-Valença, L. P. A, Valenca, MM; Velasco, TR. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology.** 2006; 12: 31-36. ISSN 1676-2649. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-26492006000100007&nrm=iso >.

Anhoury S, Brown RJ, Krishnamoorthy ES, Trimble MR. Psychiatric outcome after temporal lobectomy: a predictive study. **Epilepsia.** 2000;41(12):1608-15. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114220> >.

Assem-Hilger E, Lanzenberger R, Savli M, Wadsak W, Mitterhauser M, Mien LK. et al. Central serotonin 1A receptor binding in temporal lobe epilepsy: a [carbonyl-(11)C]WAY-100635 PET study. **Epilepsy Behav.** 2010;19(3):467-73. ISSN 1525-5069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20850389> >.

Assié MB, Ravailhe V, Faucillon V, Newman-Tancredi A.. Contrasting contribution of 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation to neurochemical profile of novel antipsychotics: frontocortical dopamine and hippocampal serotonin release in rat brain. **J Pharmacol Exp Ther.** 2005;315(1):265-72. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987834> >.

Avanzini, G. Animal models relevant to human epilepsies. **Ital J Neurol Sci.** 1995;16(1-2):5-8. ISSN 0392-0461. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642352> >.

Aydemir N, Ozkara C, Canbeyli R, Tekcan A. Changes in quality of life and self-perspective related to surgery in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Behav.** 2004;5(5):735-42. ISSN 1525-5050. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15380127> >.

Baumann MH, Ayestas MA, Rothman RB.. Functional consequences of central serotonin depletion produced by repeated fenfluramine administration in rats. **J Neurosci.** 1998;18(21):9069-77. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9787010> >.

Beleza P. Refractory epilepsy: a clinically oriented review. **Eur Neurol.** 2009;62(2):65-71. ISSN 1421-9913. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19521080> >.

Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. **Annu Rev Med.** 2009;60:355-66. ISSN 1545-326X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630576> >.

Berumen LC, Rodríguez A, Miledi R, García-Alcocer G. Serotonin receptors in hippocampus. **ScientificWorldJournal.** 2012;2012:823493. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22629209> >.

Blümcke I. Neuropathology of focal epilepsies: a critical review. **Epilepsy Behav.** 2009;15(1): 34-9. ISSN 1525-5069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19248840> >.

Blümcke I, Coras R, Miyata H, Ozkara C.. Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Brain Pathol.** 2012;22(3):402-11. ISSN 1750-3639. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22497612> >.

Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. **Epilepsia.** 2013;54(7):1315-29. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23692496> >.

Bortolozzi A, Díaz-Mataix L, Scorza MC, Celada P, Artigas F. The activation of 5-HT receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. **J Neurochem.** 2005;95(6):1597-607. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16277612> >.

Briellmann RS, Hopwood MJ, Jackson GD. Major depression in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: clinical and imaging correlates. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2007; 78(11):1226-30. ISSN 1468-330X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17259350> >.

Broderick PA, Pacia SV, Doyle WK, Devinsky O.. Monoamine neurotransmitters in resected hippocampal subparcellations from neocortical and mesial temporal lobe epilepsy patients: in situ microvoltammetric studies. **Brain Res.** 2000;878(1-2):48-63. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996135> >.

Browning RA, Wood AV, Merrill MA, Dailey JW, Jobe PC. Enhancement of the anticonvulsant effect of fluoxetine following blockade of 5-HT_{1A} receptors. **Eur J Pharmacol.** 1997;336(1):1-6. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9384247> >.

Buchanan GF, Murray NM, Hajek MA, Richerson GB. Serotonin neurones have anti-convulsant effects and reduce seizure-induced mortality. **J Physiol.** 2014;592(19):4395-410. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25107926> >.

Camacho DL, Castillo M.. MR imaging of temporal lobe epilepsy. **Semin Ultrasound CT MR.** 2007; 28(6):424-36. ISSN 0887-2171. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18074999> >.

Carr GV, Lucki I.. The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. **Psychopharmacology (Berl).** 2011;213(2-3):265-87. ISSN 1432-2072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21107537> >.

Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. **Ital J Neurol Sci.** 1995;16(1-2):33-7. ISSN 0392-0461. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642349> >.

Cavalheiro EA, Fernandes MJ, Turski L, Naffah-Mazzacoratti MG. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia.** 1994;35(1): 1-11. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8112229> >.

Charnay Y, Léger L. Brain serotonergic circuitries. **Dialogues Clin Neurosci.** 2010;12(4):471-87. ISSN 1294-8322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21319493> >.

Cheetham SC, Crompton MR, Katona CL, Horton RW. Brain 5-HT₁ binding sites in depressed suicides. **Psychopharmacology (Berl).** 1990;102(4):544-8. ISSN 0033-3158. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2096412> >.

Cloix JF, Tahi Z, Boissonnet A, Hévor T.. Brain glycogen and neurotransmitter levels in fast and slow methionine sulfoximine-selected mice. **Exp Neurol.** 2010;225(2):274-83. ISSN 1090-2430. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547153> >.

Cloix JF, Tahi Z, Martin B, Hévor T.. Selection of two lines of mice based on latency to onset of methionine sulfoximine seizures. **Epilepsia.** 2010;51(1):118-28. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015245> >.

Cuellar-Herrera M, Velasco AL, Velasco F, Trejo D, Alonso-Vanegas M, Nuche-Bricaire A, et al. Alterations of 5-HT_{1A} receptor-induced G-protein functional activation and relationship to memory deficits in patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res.** 2014;108(10):1853-63. ISSN 1872-6844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25304920> >.

D'Alessio L, Giagante B, Papayannis C, Oddo S, Silva W, Solís P, et al. Psychotic disorders in Argentine patients with refractory temporal lobe epilepsy: a case-control study. **Epilepsy Behav.** 2009;14(4):604-9. ISSN 1525-5069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236954> >.

Dailey JW, Mishra PK, Ko KH, Penny JE, Jobe PC. Serotonergic abnormalities in the central nervous system of seizure-naïve genetically epilepsy-prone rats. **Life Sci.** 1992;50(4):319-26. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1732702> >.

Dailey JW, Reigel CE, Mishra PK, Jobe PC. Neurobiology of seizure predisposition in the genetically epilepsy-prone rat. **Epilepsy Res.** 1989;3(1):3-17. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2563686> >.

Dailey JW, Reith ME, Yan QS, Li MY, Jobe PC. Anticonvulsant doses of carbamazepine increase hippocampal extracellular serotonin in genetically epilepsy-prone rats: dose response relationships. **Neurosci Lett.** 1997;227(1):13-6. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9178847> >.

Dailey JW, Yan QS, Mishra PK, Burger RL, Jobe PC. Effects of fluoxetine on convulsions and on brain serotonin as detected by microdialysis in genetically epilepsy-prone rats. **J Pharmacol Exp Ther.** 1992;260(2):533-40. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1738103> >.

Daws LC, Gould GG. Ontogeny and regulation of the serotonin transporter: providing insights into human disorders. **Pharmacol Ther.** 2011;131(1):61-79. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21447358> >.

Dayer A. Serotonin-related pathways and developmental plasticity: relevance for psychiatric disorders. **Dialogues Clin Neurosci.** 2014;16(1):29-41. ISSN 1958-5969. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24733969> >.

De Deurwaerdère P, Di Giovanni G. Serotonergic modulation of the activity of mesencephalic dopaminergic systems: Therapeutic implications. **Prog Neurobiol.** 2017;151:175-236. ISSN 1873-5118. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27013075> >.

Dekker AD, Vermeiren Y, Carmona-Iragui M, Benejam B, Videla L, Gelpi E, et al. Monoaminergic impairment in Down syndrome with Alzheimer's disease compared to early-onset Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement (Amst).** 2018;10:99-111. ISSN 2352-8729. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29780859> >.

Didelot A, Ryvlin P, Lothe A, Merlet I, Hammers A, Mauguière F. PET imaging of brain 5-HT_{1A} receptors in the preoperative evaluation of temporal lobe epilepsy. **Brain**. 2008;131(Pt 10): 2751-64. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18790822> >.

Donaldson ZR, Hen R.. From psychiatric disorders to animal models: a bidirectional and dimensional approach. **Biol Psychiatry**. 2015;77(1):15-21. ISSN 1873-2402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24650688>

Dorfer C, Czech T, Aull-Watschinger S, Baumgartner C, Jung R, Kasprian G. et al. Mesial temporal lobe epilepsy: long-term seizure outcome of patients primarily treated with transsylvian selective amygdalohippocampectomy. **J Neurosurg**. 2018;129(1):174-181. ISSN 1933-0693. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29027855> >.

Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, et al. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. **Biol Psychiatry**. 1999;46(10):1375-87. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10578452> >.

Eid T, Ghosh A, Wang Y, Beckström H, Zaveri HP, Lee TS, et al. Recurrent seizures and brain pathology after inhibition of glutamine synthetase in the hippocampus in rats. **Brain**. 2008; 131(Pt 8):2061-70. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669513> >.

Engel J Jr, Pitkänen A, Loeb JA, Dudek FE, Bertram EH 3rd, Cole AJ, et al. Epilepsy biomarkers. **Epilepsia**. 2013;54(Suppl 4): 61-9. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23909854> >.

Englot DJ, Rolston JD, Wang DD, Sun PP, Chang EF, Auguste KI. Seizure outcomes after temporal lobectomy in pediatric patients. **J Neurosurg Pediatr**. 2013;12(2):134-41. ISSN 1933-0715. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23768202> >.

Faingold CL. The genetically epilepsy-prone rat. **Gen Pharmacol**. 1988;19(3):331-8. ISSN 0306-3623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2901380> >.

Faingold CL, Randall M, Mhaskar Y, Uteshev VV. Differences in serotonin receptor expression in the brainstem may explain the differential ability of a serotonin agonist to block seizure-induced sudden death in DBA/2 vs. DBA/1 mice. **Brain Res**. 2011;1418:104-10. ISSN 1872-6240. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920504> >.

Faingold CL, Randall M, Zeng C, Peng S, Long X, Feng HJ. Serotonergic agents act on 5-HT. **Epilepsy Behav**. 2016;64(Pt A):166-170. ISSN 1525-5069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27743549> >.

Faingold CL, Tupal S, Randall M. Prevention of seizure-induced sudden death in a chronic SUDEP model by semichronic administration of a selective serotonin reuptake inhibitor. **Epilepsy Behav.** 2011;22(2):186-9. ISSN 1525-5069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21783426> >.

Favale E, Audenino D, Cocito L, Albano C. The anticonvulsant effect of citalopram as an indirect evidence of serotonergic impairment in human epileptogenesis. **Seizure.** 2003;12(5):316-8. ISSN 1059-1311. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810346> >.

Favale E, V. Rubino, P. Mainardi, G. Lunardi, C. Albano Anticonvulsant effect of fluoxetine in humans. **Neurology.** 1995;45(10):1926-7. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7477995> >.

Fazel S, Wolf A, Långström N, Newton CR, Lichtenstein P. Premature mortality in epilepsy and the role of psychiatric comorbidity: a total population study. **Lancet.** 2013;382(9905):1646-54. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3899026/> >.

Feng HJ, Faingold CL. Abnormalities of serotonergic neurotransmission in animal models of SUDEP. **Epilepsy Behav.** 2017;71(Pt B):174-180. ISSN 1525-5069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26272185> >.

Feng J, Cai X, Zhao J, Yan Z. Serotonin receptors modulate GABA(A) receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. **J Neurosci.** 2001;21(17):6502-11. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517239> >.

Ferrari F, Villa RF. The Neurobiology of Depression: an Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence. **Mol Neurobiol.** 2017;54(7):4847-4865. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27510505> >.

Fisher PD, Sperber EF, Moshé SL. Hippocampal sclerosis revisited. **Brain Dev,** 1998;20(8):563-73. ISSN 0387-7604. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9865538> >.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia.** 2014;55(4):475-82. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24730690> >.

Forsgren L, Nyström L. An incident case-referent study of epileptic seizures in adults. **Epilepsy Res.** 1990;6(1):66-81.. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2357957> >.

Gaitatzis A, Trimble MR, Sander JW. The psychiatric comorbidity of epilepsy. **Acta Neurol Scand.** 2004;110(4):207-20.. ISSN 0001-6314. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15355484> >.

Gattaz WF, Valente KD, Raposo NR, Vincentiis S, Talib LL. Increased PLA2 activity in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy and psychosis. **J Psychiatr Res.** 2011 ;45(12):1617-20.. ISSN 1879-1379. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21813137> >.

García-Morales I, de la Peña Mayor P, Kanner AM. Psychiatric comorbidities in epilepsy: identification and treatment. **Neurologist.** 2008;14(6 Suppl 1):S15-25. . ISSN 1074-7931. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19225366> >.

Giovacchini G, Toczek MT, Bonwetsch R, Bagic A, Lang L, Fraser C, et al. 5-HT 1A receptors are reduced in temporal lobe epilepsy after partial-volume correction. **J Nucl Med.** 2005;46(7):1128-35. ISSN 0161-5505. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000281> >.

Giussani G, Franchi C, Messina P, Nobili A, Beghi E; EPIRES Group. Prevalence and incidence of epilepsy in a well-defined population of Northern Italy. **Epilepsia.** 2014 Oct;55(10):1526-33. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25090941> >.

Goldberg EM, Coulter DA. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. **Nat Rev Neurosci.** 2013;14(5):337-49. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23595016> >.

Gonçalves EB, Cendes F. Depression in patients with refractory temporal lobe epilepsy. **Arq Neuropsiquiatr.** 2011;69(5):775-7. ISSN 1678-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22042180> >.

Gonçalves-Ferreira A, Campos AR, Herculano-Carvalho M, Pimentel J, Bentes C, Peralta AR, et al. Amygdalohippocampotomy: surgical technique and clinical results. **J Neurosurg.** 2013 ;118(5):1107-13. ISSN 1933-0693. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432145> >.

Graebnitz S, Kedo O, Speckmann EJ, Gorji A, Panneck H, Hans V, et al. Interictal-like network activity and receptor expression in the epileptic human lateral amygdala. **Brain.** 2011;134(Pt 10):2929-47. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21893592> >.

Hamon M, Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 2013;45:54-63. ISSN 1878-4216. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23602950> >.

Hasler G, Bonwetsch R, Giovacchini G, Toczek MT, Bagic A, Luckenbaugh DA, et al. 5-HT_{1A} receptor binding in temporal lobe epilepsy patients with and without major depression. **Biol Psychiatry**. 2007;62(11):1258-64. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17588547> >.

Hecimovic H, et al. Neuroanatomical and Neurobiological Bases of Psychiatric Disorders. In: ETTINGER, A. B. e KANNER, A. M. (Ed.). **Psychiatric Issues in Epilepsy: A Practical Guide to Diagnosis and Treatment**. First. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, 2001. cap. 7, p.400. ISBN 97807817217690781721768.

Hensler JG, Artigas F, Bortolozzi A, Daws LC, De Deurwaerdère P, Milan L, et al. Catecholamine/Serotonin interactions: systems thinking for brain function and disease. **Adv Pharmacol**. 2013;68:167-97. ISSN 1557-8925. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24054145> >.

Hesdorffer DC, Hauser WA, Annegers JF, Cascino G. Major depression is a risk factor for seizures in older adults. **Ann Neurol**. 2000;47(2):246-9. ISSN 0364-5134. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10665498> >.

Hesdorffer DC, Hauser WA, Olafsson E, Ludvigsson P, Kjartansson O. Depression and suicide attempt as risk factors for incident unprovoked seizures. **Ann Neurol**. 2006;59(1):35-41. ISSN 0364-5134. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16217743> >.

Hitiris N, Mohanraj R, Norrie J, Sills GJ, Brodie MJ.. Predictors of pharmacoresistant epilepsy. **Epilepsy Res**. 2007;75(2-3):192-6. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17628429> >.

Holm E, Foged MT, Beniczky S, Jespersen B, Brennum J, Pinborg LH. Efficacy of the Danish epilepsy surgery programme. **Acta Neurol Scand**. 2018;137(2):245-251. ISSN 1600-0404. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28994451> >.

Ito S, Suhara T, Ito H, Yasuno F, Ichimiya T, Takano A, et al. Changes in central 5-HT_{1A} receptor binding in mesial temporal epilepsy measured by positron emission tomography with [(11)C]WAY100635. **Epilepsy Res**. 2007;73(1):111-8. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17097271> >.

Jobe PC, Brown RD, Dailey JW. Effect of Ro 4-1284 on audiogenic seizure susceptibility and intensity in epilepsy-prone rats. **Life Sci**. 1981;28(18):2031-8. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6909499> >.

Jobe PC, Dailey JW. Genetically Epilepsy-Prone Rats (GEPRs) in Drug Research. **CNS Drug Reviews**. 2000;6(3):241-260. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1527-3458.2000.tb00150.x> >.

Jobe PC, Dailey JW, Reigel CE. Noradrenergic and serotonergic determinants of seizure susceptibility and severity in genetically epilepsy-prone rats. **Life Sci.** 1986;39(9):775-82. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3747729> >.

Jobe PC, Dailey JW, Wernicke JF. A noradrenergic and serotonergic hypothesis of the linkage between epilepsy and affective disorders. **Crit Rev Neurobiol.** 1999;13(4):317-56. ISSN 0892-0915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11028680> >.

Jobe PC, Laird HE 2nd, Ko KH, Ray T, Dailey JW. Abnormalities in monoamine levels in the central nervous system of the genetically epilepsy-prone rat. **Epilepsia.** 1982;23(4):359-66. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6284498> >.

Jobe PC, Mishra PK, Adams-Curtis LE, Deoskar VU, Ko KH, Browning RA, et al. The genetically epilepsy-prone rat (GEPR). **Ital J Neurol Sci.** 1995;16(1-2):91-9. ISSN 0392-0461. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642359> >.

Josephson CB, Dykeman J, Fiest KM, Liu X, Sadler RM, Jette N, et al. Systematic review and meta-analysis of standard vs selective temporal lobe epilepsy surgery. **Neurology.** 2013;80(18):1669-76. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23553475> >.

Kandratavicius L, Rosa-Neto P, Monteiro MR, Guiot MC, Assirati JA Jr, Carlotti CG Jr. Distinct increased metabotropic glutamate receptor type 5 (mGluR5) in temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis. **Hippocampus.** 2013;23(12):1212-30. ISSN 1098-1063. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23804486> >.

Kandratavicius L, Monteiro MR, Hallak JE, Carlotti CG Jr, Assirati JA Jr, Leite JP. Microtubule-associated proteins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities and their relation with granular cell layer dispersion. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 960126, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069608> >.

Kandratavicius L, Monteiro MR, Assirati JA Jr, Carlotti CG Jr, Hallak JE, Leite JP, et al. Neurotrophins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities. **J Neuropathol Exp Neurol.** 2013;72(11):1029-42. ISSN 1554-6578. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24128677> >.

Kanner AM. Depression in epilepsy: a neurobiologic perspective. **Epilepsy Curr.** 2005;5(1):21-7. ISSN 1535-7597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16059450> >.

Kanner AM. Mood disorder and epilepsy: a neurobiologic perspective of their relationship. **Dialogues Clin Neurosci.** 2008;10(1):39-45. ISSN 1294-8322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18472483> >.

Kanner AM. Depression and epilepsy: a review of multiple facets of their close relation. **Neurol Clin.** 2009;27(4):865-80. ISSN 1557-9875. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19853213> >.

Kanner AM. Hippocampal atrophy: another common pathogenic mechanism of depressive disorders and epilepsy? **Epilepsy Curr.** 2011;11(5):149-50. ISSN 1535-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020737> >.

Kanner AM. Epilepsy: Psychiatric comorbidities and premature death in epilepsy. **Nat Rev Neurol.** 2013;9(11):606-8. ISSN 1759-4766. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24166201> >.

Kanner AM, Byrne R, Chicharro A, Wu J, Frey M. A lifetime psychiatric history predicts a worse seizure outcome following temporal lobectomy. **Neurology.** 2009;72(9):793-9. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255406> >.

Kim SW, Shin IS, Kim JM, Youn T, Yang SJ, et al. The 5-HT₂ receptor profiles of antipsychotics in the pathogenesis of obsessive-compulsive symptoms in schizophrenia. **Clin Neuropharmacol.** 2009;32(4):224-6. ISSN 1537-162X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644229> >.

Klemenhagen KC, Gordon JA, David DJ, Hen R, Gross CT. Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT_{1A} receptor. **Neuropsychopharmacology.** 2006;31(1):101-11. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15920501> >.

Koch-Stoecker SC, Bien CG, Schulz R, May TW. Psychiatric lifetime diagnoses are associated with a reduced chance of seizure freedom after temporal lobe surgery. **Epilepsia.** 2017;58(6):983-993. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28378900> >.

Krucoff MO, Chan AY, Harward SC, Rahimpour S, Rolston JD, Muh C, et al. Rates and predictors of success and failure in repeat epilepsy surgery: A meta-analysis and systematic review. **Epilepsia.** 2017;58(12):2133-2142. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28994113> >.

Kumar U, Medel-Matus JS, Redwine HM, Shin D, Hensler JG, Sankar R, et al. Effects of selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors on depressive- and impulsive-like behaviors and on monoamine transmission in experimental temporal lobe epilepsy. **Epilepsia.** 2016 ;57(3):506-15. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26813337> >.

Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**. 2010;51(6):1069-77. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19889013> >.

Kwan P, Sperling MR. Refractory seizures: try additional antiepileptic drugs (after two have failed) or go directly to early surgery evaluation? **Epilepsia**. 2009;50 Suppl 8:57-62. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19702735> >.

Köhler S, Cierpinsky K, Kronenberg G, Adli M. The serotonergic system in the neurobiology of depression: Relevance for novel antidepressants. **J Psychopharmacol**. 2016;30(1):13-22. ISSN 1461-7285. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26464458> >.

Leopoldo M, Lacivita E, Berardi F, Perrone R, Hedlund PB. Serotonin 5-HT₇ receptor agents: Structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. **Pharmacol Ther**. 2011;129(2):120-48. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20923682> >.

Liew CJ, Lim YM, Bonwetsch R, Shamim S, Sato S, Reeves-Tyer P, et al. 18F-FCWAY and 18F-FDG PET in MRI-negative temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**. 2009;50(2):234-9. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18801033> >.

Lin W, Huang W, Chen S, Lin M, Huang Q, Huang H. The Role of 5-HTR₆ in Mossy Fiber Sprouting: Activating Fyn and p-ERK1/2 in Pilocarpine-Induced Chronic Epileptic Rats. **Cell Physiol Biochem**. 2017;42(1):231-241. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28535499> >.

Lin WH, Huang HP, Lin MX, Chen SG, Lv XC, Che CH, et al. Seizure-induced 5-HT release and chronic impairment of serotonergic function in rats. **Neurosci Lett**. 2013;534:1-6. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23276638> >.

Lothe A, Didelot A, Hammers A, Costes N, Saoud M, Gilliam F, et al. Comorbidity between temporal lobe epilepsy and depression: a [18F]MPPF PET study. **Brain**. 2008;131(Pt 10):2765-82. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18765418> >.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. 1951 Nov;193(1):265-75. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713> >.

Lundberg J, Tiger M, Landén M, Halldin C, Farde L. Serotonin transporter occupancy with TCAs and SSRIs: a PET study in patients with major depressive disorder. **Int J Neuropsychopharmacol.** 2012;15(8):1167-72. ISSN 1469-5111. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22243688> >.

Lv J, Liu F. The Role of Serotonin beyond the Central Nervous System during Embryogenesis. **Front Cell Neurosci.** 2017;11:74. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28348520> >.

Magiorkinis E, Diamantis A, Sidiropoulou K, Panteliadis C. Highlights in the history of epilepsy: the last 200 years. **Epilepsy Res Treat.** 2014;2014:582039. ISSN 2090-1348. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25210626> >.

Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A. Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. **Epilepsy Behav.** 2010;17(1):103-8. ISSN 1525-5069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19963440> >.

Malmgren K, Thom M. Hippocampal sclerosis--origins and imaging. **Epilepsia.** 2012;53 Suppl 4:19-33. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22946718> >.

Mann JJ. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. **Neuropsychopharmacology.** 1999;21(2 Suppl):99S-105S.. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10432495> >.

Manna I, Labate A, Gambardella A, Forabosco P, La Russa A, Le Piane E, et al. Serotonin transporter gene (5-Htt): association analysis with temporal lobe epilepsy. **Neurosci Lett.** 2007;421(1):52-6. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548158> >.

Martinez A, Finegersh A, Cannon DM, Dustin I, Nugent A, Herscovitch P, et al. The 5-HT1A receptor and 5-HT transporter in temporal lobe epilepsy. **Neurology.** 2013;80(16):1465-71. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23516322> >.

Matsuura M, Oana Y, Kato M, Kawana A, Kan R, Kubota H, et al. A multicenter study on the prevalence of psychiatric disorders among new referrals for epilepsy in Japan. **Epilepsia.** 2003 ;44(1):107-14.. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12581237> >.

Mazarati A, Siddarth P, Baldwin RA, Shin D, Caplan R, Sankar R. Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine. **Brain.** 2008;131(Pt 8):2071-83. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559371> >.

Meltzer HY, Massey BW. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. **Curr Opin Pharmacol.** 2011;11(1):59-67. ISSN 1471-4973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420906> >.

Menzler K, Iwinska-Zelder J, Shiratori K, Jaeger RK, Oertel WH, Hamer HM. et al. Evaluation of MRI criteria (1.5 T) for the diagnosis of hippocampal sclerosis in healthy subjects. **Epilepsy Res.** 2010 ;89(2-3):349-54. ISSN 1872-6844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307956> >.

Merlet I, Ostrowsky K, Costes N, Ryvlin P, Isnard J, Faillenot I, et al. 5-HT_{1A} receptor binding and intracerebral activity in temporal lobe epilepsy: an [18F]MPPF-PET study. **Brain.** 2004;127(Pt 4):900-13. ISSN 0006-8950. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985263> >.

Merrill MA, Clough RW, Dailey JW, Jobe PC, Browning RA. Localization of the serotonergic terminal fields modulating seizures in the genetically epilepsy-prone rat. **Epilepsy Res.** 2007;76(2-3):93-102. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689928> >.

Mishra PK, Dailey JW, Reigel CE, Jobe PC. Brain norepinephrine and convulsions in the genetically epilepsy-prone rat: sex-dependent responses to Ro 4-1284 treatment. **Life Sci.** 1988;42(11):1131-7. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3347143> >.

Mnie-Filali O, Lambás-Señas L, Zimmer L, Haddjeri N. 5-HT₇ receptor antagonists as a new class of antidepressants. **Drug News Perspect.** 2007;20(10):613-8. ISSN 0214-0934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18301795> >.

Mori A, Hiramatsu M, Namba S, Nishimoto A, Ohmoto T, Mayanagi Y, et al. Decreased dopamine level in the epileptic focus. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol.** 1987;56(2):157-64. ISSN 0034-5164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3602584> >.

Moshé SL, Perucca E, Ryvlin P, Tomson T. Epilepsy: new advances. **Lancet.** 2015;385(9971):884-98. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260236> >.

Mulinari S. Monoamine theories of depression: historical impact on biomedical research. **J Hist Neurosci.** 2012;21(4):366-92. ISSN 1744-5213. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22947380> >.

Naffah-Mazzacoratti MG, Amado D, Cukiert A, Gronich G, Marino R, Calderazzo L, et al. Monoamines and their metabolites in cerebrospinal fluid and temporal cortex of epileptic patients. **Epilepsy Res.** 1996 Oct;25(2):133-7. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8884171> >.

Noguchi K, Watanabe T, Higuchi S, Chiba K. Determination of YM992, a novel selective serotonin reuptake inhibitor, in rat and dog plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Biomed Chromatogr.** 2000;14(4):269-73. ISSN 0269-3879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861739> >.

Pacia SV, Doyle WK, Broderick PA. Biogenic amines in the human neocortex in patients with neocortical and mesial temporal lobe epilepsy: identification with in situ microvoltammetry. **Brain Res.** 2001;899(1-2):106-11. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11311871> >.

Palomero-Gallagher N, Schleicher A, Bidmon HJ, Pannek HW, Hans V, Gorji A, et al. Multireceptor analysis in human neocortex reveals complex alterations of receptor ligand binding in focal epilepsies. **Epilepsia.** 2012;53(11):1987-97. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22957946> >.

Parsey RV, Ogden RT, Miller JM, Tin A, Hesselgrave N, Goldstein E, et al. Higher serotonin 1A binding in a second major depression cohort: modeling and reference region considerations. **Biol Psychiatry.** 2010;68(2):170-8. ISSN 1873-2402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497898> >.

Peixoto-Santos JE, Galvis-Alonso OY, Velasco TR, Kandratavicius L, Assirati JA, Carlotti CG, et al. Increased metallothionein I/II expression in patients with temporal lobe epilepsy. **PLoS One.** 2012;7(9):e44709. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23028585> >.

Perini GI, Tosin C, Carraro C, Bernasconi G, Canevini MP, Canger R, et al. Interictal mood and personality disorders in temporal lobe epilepsy and juvenile myoclonic epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 1996;61(6):601-5. ISSN 0022-3050. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8971108> >.

Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem.** 1977;83(2):346-56. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/603028> >.

Picard M, Cloix JF, Hevor TK. Serotonergic neurotransmission plays a major role in the action of the glycolytic convulsant methionine sulfoximine. **Neurosci Res.** 2011;70(3):313-20. ISSN 1872-8111. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21396968> >.

Pineda E, Shin D, Sankar R, Mazarati AM. Comorbidity between epilepsy and depression: experimental evidence for the involvement of serotonergic, glucocorticoid, and neuroinflammatory mechanisms. **Epilepsia.** 2010;51 Suppl 3:110-4. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618414> >.

Pineda EA, Hensler JG, Sankar R, Shin D, Burke TF, Mazarati AM. Interleukin-1 β causes fluoxetine resistance in an animal model of epilepsy-associated depression. **Neurotherapeutics**. 2012;9(2):477-85. ISSN 1878-7479. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427156> >.

Pineda EA, Hensler JG, Sankar R, Shin D, Burke TF, Mazarati AM. Plasticity of presynaptic and postsynaptic serotonin 1A receptors in an animal model of epilepsy-associated depression. **Neuropsychopharmacology**. 2011;36(6):1305-16. ISSN 1740-634X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21346733> >.

Pintor M, Mefford IN, Hutter I, Pocotte SL, Wyler AR, Nadi NS. Levels of biogenic amines, their metabolites, and tyrosine hydroxylase activity in the human epileptic temporal cortex. **Synapse**. 1990;5(2):152-6. ISSN 0887-4476. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1968684> >.

Pugh MJ, Copeland LA, Zeber JE, Cramer JA, Amuan ME, Cavazos JE, et al. The impact of epilepsy on health status among younger and older adults. **Epilepsia**. 2005;46(11):1820-7. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16302863> >.

Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felšöci M. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. **Physiol Res**. 2011;60(1):15-25. ISSN 1802-9973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20945968> >.

Rakitin A, Liik M, Oun A, Haldre S. Mortality risk in adults with newly diagnosed and chronic epilepsy: a population-based study. **Eur J Neurol**. 2011;18(3):465-70. ISSN 1468-1331. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20727008> >.

Ribot R, Ouyang B, Kanner AM. The impact of antidepressants on seizure frequency and depressive and anxiety disorders of patients with epilepsy: Is it worth investigating? **Epilepsy Behav**. 2017;70(Pt A):5-9. ISSN 1525-5069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28407526> >.

Rocha L, Lorigados-Pedre L, Orozco-Suárez S, Morales-Chacón L, Alonso-Vanegas M, García-Maeso I, et al. Autoradiography reveals selective changes in serotonin binding in neocortex of patients with temporal lobe epilepsy. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 2007;31(6):1208-18. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513030> >.

Rocha L, Alonso-Vanegas M, Villeda-Hernández J, Mújica M, Cisneros-Franco JM, López-Gómez M, et al. Dopamine abnormalities in the neocortex of patients with temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis**. 2012;45(1):499-507. ISSN 1095-953X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21964255> >.

Sagher O, Thawani JP, Etame AB, Gomez-Hassan DM. Seizure outcomes and mesial resection volumes following selective amygdalohippocampectomy and temporal lobectomy. **Neurosurg Focus**. 2012;32(3):E8. ISSN 1092-0684. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22380862> >.

Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, et al. Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [11C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. **Arch Gen Psychiatry**. 2000;57(2):174-80. ISSN 0003-990X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10665620> >.

Savic I, Lindström P, Gulyás B, Halldin C, Andréa B, Farde L. Limbic reductions of 5-HT_{1A} receptor binding in human temporal lobe epilepsy. **Neurology**. 2004;62(8):1343-51. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111672> >.

Scharfman HE. The neurobiology of epilepsy. **Curr Neurol Neurosci Rep**. 2007;7(4):348-54. ISSN 1528-4042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618543> >.

Schmidt D. Drug treatment of epilepsy: options and limitations. **Epilepsy Behav**. 2009;15(1):56-65. ISSN 1525-5069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236951> >.

Scorza F, Tucci PJ. Sudden death in Brazil: epilepsy should be in horizon. **Arq Bras Cardiol**. 2015;105(2):197-8. ISSN 1678-4170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26352179> >.

Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Scerni DA, Calderazzo L, Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **An Acad Bras Cienc**. 2009;81(3):345-65. ISSN 1678-2690. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722008> >.

Sendrowski K, Sobaniec W. Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. **Pharmacol Rep**. 2013;65(3):555-65. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23950578> >.

Seymour N, Granbichler CA, Polkey CE, Nashef L. Mortality after temporal lobe epilepsy surgery. **Epilepsia**. 2012;53(2):267-71. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22126418> >.

Smolders I, Clinckers R, Meurs A, De Bundel D, Portelli J, Ebinger G. et al. Direct enhancement of hippocampal dopamine or serotonin levels as a pharmacodynamic measure of combined antidepressant-anticonvulsant action. **Neuropharmacology**. 2008;54(6):1017-28. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18378264> >.

Statnick MA, Dailey JW, Jobe PC, Browning RA. Abnormalities in brain serotonin concentration, high-affinity uptake, and tryptophan hydroxylase activity in severe-seizure genetically epilepsy-prone rats. **Epilepsia**. 1996;37(4):311-21. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603634> >.

Steer S, Pickrell WO, Kerr MP, Thomas RH. Epilepsy prevalence and socioeconomic deprivation in England. **Epilepsia**. 2014;55(10):1634-41. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182657> >.

Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, Rajkowska G. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. **J Neurosci**. 1998;18(18):7394-401. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9736659> >.

Talib L L, Joaquim HP, De Paula VJ. Metodologia em Neuroquímica. In: (Ed.). **Clínica Psiquiátrica: a visão do Departamento e do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP**. Primeira. São Paulo, SP: Manole. 2011;2:2048-2058. ISBN 9788520431382.

Tatum WO . Mesial temporal lobe epilepsy. **J Clin Neurophysiol**. 2012;29(5):356-65. ISSN 1537-1603. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23027091> >.

Tellez-Zenteno JF, Patten SB, Jetté N, Williams J, Wiebe S. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. **Epilepsia**. 2007;48(12):2336-44. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17662062> >.

Thom M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. **Neuropathol Appl Neurobiol**. 2014 ;40(5):520-43. ISSN 1365-2990. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24762203> >.

Toczek MT, Carson RE, Lang L, Ma Y, Spanaki MV, Der MG, et al. PET imaging of 5-HT1A receptor binding in patients with temporal lobe epilepsy. **Neurology**. 2003;60(5):749-56. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629228> >.

Trindade-Filho EM, de Castro-Neto EF, de A Carvalho R, Lima E, Scorza FA, Amado D, et al. Serotonin depletion effects on the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res**. 2008;82(2-3):194-9. ISSN 1872-6844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845420> >.

Trottier S, Evrard B, Vignal JP, Scarabin JM, Chauvel P. The serotonergic innervation of the cerebral cortex in man and its changes in focal cortical dysplasia. **Epilepsy Res**. 1996;25(2):79-106. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8884167> >.

Türk I. Anatomy of the serotonergic system. **Ann N Y Acad Sci.** 1990;600:9-34; discussion 34-5.. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2252340> >.

Umeda S, Stagliano GW, Borenstein MR, Raffa RB. A reverse-phase HPLC and fluorescence detection method for measurement of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in Planaria. **J Pharmacol Toxicol Methods.** 2005;51(1):73-6.. ISSN 1056-8719. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596117> >.

Uteshev VV, Tupal S, Mhaskar Y, Faingold CL. Abnormal serotonin receptor expression in DBA/2 mice associated with susceptibility to sudden death due to respiratory arrest. **Epilepsy Res.** 2010;88(2-3):183-8. ISSN 1872-6844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20018491> >.

Vannemreddy PS, Kanner AM, Smith MC, Rossi M, Wallace D, Vannemreddy SN, et al. Chronic epilepsy due to low grade temporal lobe tumors and due to hippocampal sclerosis: do they differ in post-surgical outcome? **J Neurooncol.** 2013;115(2):225-31. ISSN 1573-7373. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23955571> >.

Veenstra-VanderWeele J, Anderson GM, Cook EH Jr. Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. **Eur J Pharmacol.** 2000;410(2-3):165-181. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11134668> >.

Vermoesen K, Massie A, Smolders I, Clinckens R. The antidepressants citalopram and reboxetine reduce seizure frequency in rats with chronic epilepsy. **Epilepsia.** 2012;53(5):870-8. ISSN 1528-1167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22429158> >.

Wang HT, Han F, Shi YX. Activity of the 5-HT_{1A} receptor is involved in the alteration of glucocorticoid receptor in hippocampus and corticotropin-releasing factor in hypothalamus in SPS rats. **Int J Mol Med.** 2009;24(2):227-31. ISSN 1107-3756. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578795> >.

Wang L, Lv Y, Deng W, Peng X, Xiao Z, Xi Z, et al. 5-HT₆ Receptor Recruitment of mTOR Modulates Seizure Activity in Epilepsy. **Mol Neurobiol.** 2015;51(3):1292-9. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25034463> >.

Witkin JM, Baez M, Yu J, Barton ME, Shannon HE. Constitutive deletion of the serotonin-7 (5-HT₇) receptor decreases electrical and chemical seizure thresholds. **Epilepsy Res.** 2007 ;75(1):39-45. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485199> >.

Yan QS, Jobe PC, Cheong JH, Ko KH, Dailey JW. Role of serotonin in the anticonvulsant effect of fluoxetine in genetically epilepsy-prone rats. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 1994 ;350(2):149-52. ISSN 0028-1298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7527501> >.

Yan QS, Mishra PK, Burger RL, Bettendorf AF, Jobe PC, Dailey JW. Evidence that carbamazepine and antiepilepsirine may produce a component of their anticonvulsant effects by activating serotonergic neurons in genetically epilepsy-prone rats. **J Pharmacol Exp Ther.** 1992;261(2):652-9.. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1374472> >.

Yang Y, Guo Y, Kuang Y, Wang S, Jiang Y, Ding Y, et al. Serotonin 1A receptor inhibits the status epilepticus induced by lithium-pilocarpine in rats. **Neurosci Bull.** 2014;30(3):401-8. ISSN 1995-8218. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24429728> >.

Yang Z, Liu X, Yin Y, Sun S, Deng X. Involvement of 5-HT₇ receptors in the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. **Eur J Pharmacol.** 2012;685(1-3):52-8. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22543085> >.

Zeng C, Long X, Cotten JF, Forman SA, Solt K, Faingold CL, et al. Fluoxetine prevents respiratory arrest without enhancing ventilation in DBA/1 mice. **Epilepsy Behav.** 2015;45:1-7. ISSN 1525-5069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25771493> >.

APÊNDICE 1. INFORMAÇÕES BÁSICAS DE SUBMISSÃO NA PLATAFORMA BRASIL

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP
PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa: Atividade serotoninérgica no hipocampo de pacientes com epilepsia de lobo temporal

Informações Preliminares

Responsável Principal

CPF/Documento: 169.920.358-00	Nome: Kette Dualibi Ramos Valente
Telefone: (11) 3079-5493	E-mail: kettevalente@msn.com

Instituição Proponente

CNPJ: 60.448.040/0001-22	Nome da Instituição: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P
--------------------------	--

Essa submissão de emenda é exclusiva do seu Centro Coordenador?

A emenda não é exclusiva de seu Centro Coordenador, então quando a emenda for aprovada, esta SERÁ replicada nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes.

É um estudo internacional? Não

■ Equipe de Pesquisa

CPF/Documento	Nome
792.963.785-91	Natascha Cardoso da Fonseca

Área de Estudo

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Ciências Básicas

Título Público da Pesquisa: Atividade serotoninérgica no hipocampo de pacientes com epilepsia de lobo temporal

Contato Público

CPF/Documento	Nome	Telefone	E-mail
169.920.358-00	Kette Dualibi Ramos Valente	(11) 3079-5493	kettevalente@msn.com

Contato Kette Dualibi Ramos Valente

APÊNDICE 1. INFORMAÇÕES BÁSICAS DE SUBMISSÃO NA PLATAFORMA BRASIL

Desenho de Estudo / Apoio Financeiro

Desenho:

Entre os indivíduos com epilepsia do lobo temporal (ELT) causada por esclerose mesial temporal (EMT), a incidência de depressão é maior do que entre aqueles com epilepsia do lobo temporal por outras causas. Estudos usando modelos animais e imagem funcional em humanos sugerem a existência de um mecanismo serotoninérgico comum. Neste estudo, nós avaliaremos a concentração de serotonina (5HT) no hipocampo dos pacientes com ELT-EMT, que forem submetidos à cirurgia devido à presença de epilepsia refratária. Propomos avaliar a afinidade de ligação dos receptores e transmissor serotoninérgicos no hipocampo destes mesmos pacientes e correlacionar estes dados com a presença de comorbidades psiquiátricas e outras variáveis clínicas da epilepsia indicadores de gravidade. Para estes objetivos, nós avaliaremos as amostras de hipocampus de pacientes cirurgicamente tratados para ELT por EMT após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A concentração de 5HT será medida através de high-performance liquid chromatography (HPLC) com detecção por fluorescência. Os receptores e transmissor de serotonina serão avaliados por Western Blot. Nossos achados podem contribuir para delinear quais mecanismos serotoninérgicos podem estar relacionados com a presença de transtornos psiquiátricos e com a gravidade da epilepsia.

Apoio Financeiro

CNPJ	Nome	E-mail	Telefone	Tipo
				Financiamento Próprio

Palavra Chave

Palavra-chave
epilepsia
serotonina
hipocampo

Detalhamento do Estudo

Resumo:

Entre os indivíduos com epilepsia do lobo temporal (ELT) causada por esclerose mesial temporal (EMT), a incidência de depressão é maior do que entre aqueles com epilepsia do lobo temporal por outras causas. Estudos usando modelos animais e imagem funcional em humanos sugerem a existência de um mecanismo serotoninérgico comum. Neste estudo, nós avaliaremos a concentração de serotonina (5HT) no hipocampo dos pacientes com ELT-EMT, que forem submetidos à cirurgia devido à presença de epilepsia refratária. Propomos avaliar a afinidade de ligação dos receptores e transmissor serotoninérgicos no hipocampo destes mesmos pacientes e correlacionar estes dados com a presença de comorbidades psiquiátricas e outras variáveis clínicas da epilepsia indicadores de gravidade. Para estes objetivos, nós avaliaremos as amostras de hipocampus de pacientes cirurgicamente tratados para ELT por EMT após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A concentração de 5HT será medida através de high-performance liquid chromatography (HPLC) com detecção por fluorescência. Os receptores e transmissor de serotonina serão avaliados por Western Blot. Nossos achados podem contribuir para delinear quais mecanismos serotoninérgicos podem estar relacionados com a presença de transtornos psiquiátricos e com a gravidade da epilepsia.

Introdução:

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a principal causa de epilepsia refratária em adultos (Beleza 2009, Tripathi et al 2011, Veriano Jr et al 2010). A ELT é também o protótipo da síndrome epilética cirurgicamente tratável (Engel et al 2012, Sagher et al 2012). Pacientes com ELT, secundárias à esclerose mesial temporal (EMT), apresentam uma maior incidência de transtornos do humor e psicose (Briellmann RS et al 2007, DiAlessio et al 2009, Gonçalves & Cendes 2011) com consequente impacto negativo nas respostas terapêuticas farmacológicas e cirúrgicas e formando fatores de risco independentes para uma pior qualidade de vida entre os pacientes com epilepsia (Anihoury et al 2000, Aydemir et al 2004, Pugh et al 2006).

1.1. ELT e Transtornos Psiquiátricos

A etiologia das comorbidades psiquiátricas em pacientes com epilepsia é multifatorial, envolvendo fatores neurobiológicos e psicossociais (revisão em Kanner 2008). Os determinantes neurobiológicos em potencial incluem idade de início da epilepsia, frequência e gravidade das crises epiléticas, tipo de epilepsia, localização do foco epilético e medicações em uso, tendo em consideração tanto o tipo, quanto o número. Os possíveis fatores psicossociais incluem estigma percebido, número elevado de eventos estressores prévios, não aceitação da epilepsia, estresse financeiro, problemas profissionais e início precoce da epilepsia (revisão em Kanner 2008, revisão em Kanner 2009).

Os estudos mais recentes demonstram uma relação bidirecional entre epilepsia e os transtornos psiquiátricos (revisão em Kanner 2006, revisão em Kanner 2011, revisão em Pineda et al 2010). Os transtornos depressivos não são restritos a pacientes com crises epiléticas fármaco-resistentes e, frequentemente, precedem o início das crises (Forsgren & Nyström 1990, Hersdoffer et al 2000). Além disto, não somente pessoas com epilepsia têm maior risco de desenvolver transtornos depressivos, mas pacientes com transtornos depressivos têm chances 3 a 7 vezes maiores de desenvolver epilepsia (Forsgren & Nyström 1990, Hersdoffer et al 2006, Hersdoffer et al 2000).

Estudos com modelos animais e com neuroimagem funcional e pós-mortem em humanos sugerem a existência de um mecanismo patogênico operante comum entre estas condições (Cheetam et al 1990, Lothe et al 2008, Savic et al 2004, Stockmeir et al 1998, Toczek et al 2003). Os mecanismos patológicos comuns incluem anormalidades no potencial de ligação de receptores de diversos neurotransmissores do sistema nervoso central, especialmente os de serotonina e anormalidades funcionais nos lobos temporais e frontais, incluindo diminuição de receptores de serotonina nas estruturas mesiais, núcleo da rafe, tálamo e giro cingulo (Drevets et al. 1999, Hasler et al 2007, revisão em Kanner 2006, revisão em Kanner 2009, revisão em Kanner 2011, Sargent et al. 2000).

1.2. Serotonina

Monoaminas, como a serotonina, produzem seus efeitos induzindo mudanças bioquímicas complexas nos neurônios pós-sinápticos do sistema nervoso central, através da interação com proteínas sinalizadoras - proteína G - dentro da membrana celular pós-sináptica. Existe uma correlação consistente entre efeito medicamentoso tendo como alvo as monoaminas e os estados afetivos e comportamentais (Kalia, 2005). Modelos monoaminérgicos de depressão advêm da observação de que pacientes com história de depressão e exposição a altas doses de reserpina droga que causa depleção das reservas monoaminérgicas, apresentavam recorrência dos sintomas depressivos (revisão

APÊNDICE 1. INFORMAÇÕES BÁSICAS DE SUBMISSÃO NA PLATAFORMA BRASIL

Garcia-Morales et al 2008, Kanner 2006, revisão em Hryjov et al em Ettinger and Kanner 2001).

Já foi demonstrado que a serotonina suprime crises epilépticas generalizadas em modelos animais (Albano 2006, Favale et al 1995, Jobe and Browning 2005, Merrill et al 2007) e diminui a gravidade das crises epilépticas em estudos (Dailey et al 1995, Yan et al 1995) com ratos geneticamente predisposto à epilepsia (GEPR). A depleção de serotonina, com consequente, aumento da regulação do receptor pós-sináptico já foi relacionado a uma maior gravidade da epilepsia. Estudos com GEPR, demonstraram que estes ratos possuem uma redução generalizada das concentrações de serotonina (Dailey et al 1992, Jobe and Dailey 2000) e, quando administradas medicações que diminuíam ainda mais estas concentrações, aumentava-se a gravidade das crises epilépticas nestes ratos (Dailey, 1992).

Além disto, a depleção de serotonina está associada à depressão. Pacientes que cometeram suicídio demonstram reservas diminuídas de serotonina, bem como um aumento no autorreceptor supressor 5HT1A nos núcleos dorsais da rafe, em tecidos cerebrais. (Cheetam et al 1990, Stockmeir et al 1998).

1.2.1. Receptores de serotonina

Os receptores serotoninérgicos são os mais numerosos e diversos do sistema de receptores de transmissão monoaminérgica. Aproximadamente 30 a 80% dos neurônios do núcleo da rafe sintetizam serotonina (revisão em Heilmov et al em Ettinger and Kanner 2001). O hipocampo recebe aferências serotoninérgicas de neurônios localizados no núcleo da rafe medial e dorsal. As vias serotoninérgicas da rafe-hipocampo desempenham um importante papel na regulação do humor e estão comprometidas com a depressão (Carr & Lucki 2011). A liberação da serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) pelos neurônios da rafe é regulada por mecanismos intrínsecos e extrínsecos. O mecanismo mais eficiente consiste na alça curta (feedback) autoinibitória que envolve receptores somatodendrícos 5HT1A. A ativação dos autorreceptores 5HT1A da rafe pela liberação local de serotonina inibe a descarga de neurônios serotoninérgicos e posterior liberação de neurotransmissor.

Atualmente, sete famílias distintas de receptores serotoninérgicos já foram identificadas (5HT1, 5HT2, 5HT3, 5HT4, 5HT5, 5HT6 e 5HT7) e inúmeras subpopulações já foram descritas. Os receptores 5HT1A, 5HT1B, 5HT2A, 5HT2C, 5HT4, 5HT6 e 5HT7 já foram descritos na regulação do humor e correlacionados a transtornos psiquiátricos (revisão em Pilyak et al 2011).

Os receptores 5HT1 são subdivididos em 5 subgrupos: 5HT1A, 5HT1B, 5HT1D, 5HT1E e 5HT1F. Eles são, em sua maioria, porém não exclusivamente, associados com proteínas G_{i/o} e inibem a produção de AMPc (revisão em Pilyak et al 2011).

Os receptores 5HT1A são os mais amplamente distribuídos de todos os receptores serotoninérgicos. No sistema nervoso central (SNC) ele está presente em maior densidade no córtex cerebral, hipocampo, septo, amígdala e núcleo da rafe. No SNC, eles agem como autorreceptores e receptores polissinápticos. No córtex, estes agem como autorreceptores, bem como receptores polissinápticos. Estes receptores estão envolvidos na inibição da descarga de neurônios, regulação da produção de ACTH e regulação do comportamento e fome (Wang et al. 2009), sendo que possivelmente desempenham um papel importante no desenvolvimento da ansiedade (Klemm et al. 2006), corroborado pelo uso de antagonistas 5HT1A no tratamento da ansiedade e depressão.

Os receptores 5HT1B estão presentes no SNC, onde eles induzem inibição pós-sináptica e efeitos comportamentais. Sua maior concentração pode ser achada nos núcleos da base, estriado e córtex frontal. Sua função depende de sua localização: no córtex pré-frontal acredita-se agir como receptor terminal, inibindo a liberação de dopamina. No estriado e nos gânglios da base acredita-se que agem como autorreceptores, inibindo a liberação de serotonina (revisão em Pilyak et al 2011).

Os receptores 5HT2 são subdivididos em 3 classes: 5HT2A, 5HT2B e 5HT2C. Estes são os principais subtipos de receptores excitatórios entre os receptores acoplados a proteína G para serotonina. Entretanto, o receptor 5HT2A pode ter um efeito inibitório em certas áreas, como o córtex visual e orbitofrontal (revisão em Pilyak et al 2011).

Os receptores 5HT2A são expressos em muitos tecidos centrais e periféricos. No SNC, receptores 5HT2A estão presentes principalmente no córtex, cláustro e gânglios da base. (Pilyak, 2011). Sua ativação no córtex pré-frontal, região cujo metabolismo está alterado em pacientes com esquizofrenia, modula a liberação de dopamina e GABA (Bortolozzi et al 2006, Feng et al 2001). Antagonistas 5HT2A, com diferentes sítios de afinidade (como risperidona, seroquel, olanzapina), são utilizados no tratamento da esquizofrenia, e já foram relacionados com a presença de sintomas obsessivos compulsivos nestes pacientes (Kim et al. 2009).

Sete variantes dos receptores 5HT4 (5HT4A-H), que diferem em si na sequência do segmento C-terminal, foram identificados. Entretanto, todas as variantes diferem apresentando uma farmacologia semelhante e estão associadas com atividade da adenil ciclase. No SNC, estes receptores modulam a liberação de neurotransmissores (acetilcolina, dopamina, serotonina e ácido gama amino butírico - GABA), reforçando a transmissão sináptica, o que pode afetar o desenvolvimento da memória (Ciranna 2006). Um estudo experimental de Lucas et al (2007) com um regime de 3 semanas de agonistas serotoninérgicos 5HT4, demonstrou uma alteração nos parâmetros considerados marcadores de ação antidepressiva (desensibilização dos autorreceptores 5HT1A, aumento do tônus nos receptores pós-sinápticos hipocámpais e aumento da fosforilação na proteína CREB e neurogênese no hipocampo), sugerindo um potencial antidepressivo dos agonistas dos receptores 5HT4, de rápida ação.

O receptor 5HT6 está localizado predominantemente no encéfalo, onde está acoplado ao estímulo de uma adenil ciclase (Carr & Lucki 2011). Duas variantes do receptor 5HT6 já foram descritas. A variante completa é composta por 440 aminoácidos e predomina nas áreas límbicas e nas zonas cerebrais extrapiramidais. A segunda variante possivelmente resulta de uma deleção da primeira, contendo 286 aminoácidos e predominando no caudado e substância negra. A importância clínica exata dos receptores 5HT6 permanece ainda incerta (Pilyak et al 2011). Existem evidências que este receptor regula a liberação de inúmeros neurotransmissores, como a acetilcolina, norepinefrina, ácido gaba-aminobutírico e dopamina, que provém um mecanismo adicional para sua possível efetividade no tratamento de transtornos psiquiátricos. Inúmeros antidepressivos (amitriptilina, imipramina, doxepina) e alguns antipsicóticos atípicos (olanzapina, quetiapina, clozapina) agem como antagonistas dos receptores 5HT6, embora sem seletividade, sugerindo uma possível associação entre estes receptores e certos transtornos psiquiátricos.

Os receptores 5HT7 são compostos por 445 aminoácidos e aumentam a ativação da adenil ciclase via proteína Gs. Ele também ativa a AMP quinase. Existem 5 isoformas do receptor (5HT7A-D), que diferem entre si pelo seu terminal C (Pilyak, M et al. 2011). Três destas variantes foram identificadas em humanos, designadas como 5-HT7a, 5-HT7b e 5-HT7c (Leopoldo et al. 2011). Todos exibem as mesmas propriedades farmacológicas e são expressos em vasos, músculos lisos extravasculares e SNC. Antipsicóticos atípicos, como a clozapina, e antidepressivos possuem grande afinidade por receptores 5HT7. Antagonistas dos receptores 5HT7 mimetizam efeitos dos inibidores seletivos de recaptação da serotonina e podem ser aplicados no tratamento da depressão e transtornos do sono (Mnie-Filali et al. 2007). No estudo de Witkin et al 2007, realizado com ratos deficientes de receptor 5HT7, os autores demonstraram que estes ratos possuíam uma redução do limiar para crises epilépticas, quando comparados à ratos selvagens.

Diversos estudos clínicos e experimentais já demonstraram que na depressão ocorre um aumento na regulação dos receptores 5HT1A da rafe, com consequente autoinibição aumentada da liberação de 5-HT. Este mecanismo também pode estar envolvido em pacientes com depressão associado com epilepsia. Em pacientes com epilepsia do lobo temporal e depressão associada, um estudo com tomografia por emissão de positrons (PET) demonstrou que a afinidade de ligação dos receptores 5HT da rafe estava aumentada e positivamente correlacionada com a gravidade dos sintomas depressivos (Lothe et al 2008).

Outros estudos em humanos com neuroimagem funcional, utilizando PET, tendo como alvo os receptores serotoninérgicos 5HT1A, sugerem um papel fisiopatológico comum da serotonina na depressão e epilepsia (Hasler et al 2007). Nestes estudos, foi demonstrada uma diminuição da ligação de serotonina em estruturas comuns das duas patologias: nas regiões temporais mesiais, giro do cíngulo e núcleo da rafe (Lothe et al 2008).

Usando modelos animais de estado de mal induzido por lítio e pilocarpina (modelo animal de epilepsia temporal), Mazarati et al. (2008) encontraram sintomas de depressão nos ratos pós estado de mal. Este estudo demonstrou uma transmissão interictal serotoninérgica rafe-hipocámpal diminuída em ratos pós estado de mal-induzido (Mazarati, 2008). Estudos posteriores evidenciaram

APÊNDICE 1. INFORMAÇÕES BÁSICAS DE SUBMISSÃO NA PLATAFORMA BRASIL

que a depressão associada com a epilepsia é acompanhada por hipersensibilização dos receptores 5HT_{1A}, em ratos pós-estado de mal induzido, quando comparados a controles saudáveis (Pineda 2010).

1.2.2. Transmissão serotoninérgica

Após a serotonina ser liberada na sinapse, ela é inativada primariamente pela recaptação do transmissor por um transportador serotoninérgico de membrana plasmática: o transportador da serotonina (SERT). Ele se localiza perisinapticamente nos terminais pré-sinápticos de células do SNC serotoninérgicas, bem como em axônios e corpos celulares de células serotoninérgicas da rafe. No SNC, o SERT é o mecanismo controlador predominante da intensidade e duração da neurotransmissão serotoninérgica (Daws & Gold 2011). Os antidepressivos tricíclicos e os inibidores de recaptação de serotonina desempenham como um de seus mecanismos de ação a inibição do transportador de serotonina, efeito corroborado por estudo com PET em pacientes com transtorno depressivo maior (Lundberg et al 2012).

1.3. Estudo em tecido humano

1.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A quantificação da serotonina e seus metabólitos em homogenatos de cérebro é uma importante estratégia comumente utilizada em estudos neurofisiológicos ou fisiopatológicos em modelos animais (Alvarez et al 1999, Nogushi et al 2000, Parrot et al 2007, Umeda et al 2005). Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é o método analítico mais amplamente utilizado. No entanto, existem poucos estudos em tecido de cérebro humano. No presente estudo foi desenvolvido um método de quantificação de 5-hidroxitriptamina (serotonina) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência em tecido de hipocampo dos seres humanos.

O HPLC é, basicamente, uma técnica de separação de moléculas de uma solução. Esta técnica emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. É capaz de realizar separações quantitativas em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Talib et al 2011). A aparelhagem para HPLC é, fundamentalmente, composta por bombas de injeção, uma coluna por onde passa a fase móvel e um detector de partículas ao final do processo. Um detector pode ser seletivo ou universal, ou seja, pode ser específico para uma amostra ou ser útil para todos os tipos de amostra. Dois tipos de detectores são muito utilizados: absorbância no ultravioleta e por fluorescência (Talib et al 2011).

Os detectores por fluorescência são os ideais para compostos fluorescentes, devido a sua alta sensibilidade. Uma alta intensidade de fluorescência é esperada de compostos que sejam conjugados ou que não podem produzir estruturas fortemente iônicas. A fase móvel deve ser cuidadosamente eleita para que não haja interferência na fluorescência da amostra, o que comprometeria totalmente uma análise quantitativa (Talib et al 2011).

1.3.2. Western Blot

Western blot é um método utilizado para detecção de proteínas em uma mistura de extrato de tecido biológico. Ele age separando estas proteínas desnaturadas, de acordo com sua massa molecular, durante eletroforese em gel de poliácridamida. Terminada a eletroforese, coloca-se o gel em contato direto com uma membrana (geralmente de nitrocelulose) e, por ação de uma nova corrente elétrica, as proteínas contidas no gel são transferidas para a membrana. Ao término da transferência, as membranas são submetidas à técnica de imunoblotting para a detecção das proteínas a partir da utilização de anticorpos específicos. Em seguida, as membranas são incubadas com anticorpos primários e secundários em condições correspondentes à proteína analisada. A detecção do complexo antígeno-anticorpo é possível pela reação de quimioluminescência amplificada, no caso do anticorpo secundário não ser conjugado a peroxidase, deve ser realizada uma terceira incubação com um composto que permita a ligação ao reagente quimioluminescente. A partir da revelação da membrana, faz-se uma densitometria com auxílio de software apropriado (Talib et al 2011). A detecção dos receptores e transportador de serotonina pode ser realizada através da técnica de Western Blot (Huang et al 2012, Xiaoying et al 2004).

Hipótese:

A hipótese do estudo atual é a de que nos pacientes com epilepsia do lobo temporal causada por esclerose mesial temporal (ELT-EMT), há uma redução da atividade serotoninérgica hipocampal, seja através dos níveis de serotonina, ou de receptores ou de transportadores e que esta redução possa estar relacionada à presença de comorbidades psiquiátricas e/ou à maior gravidade da epilepsia. Este será o primeiro estudo medindo a concentração de serotonina e avaliando níveis de receptores e transportadores em tecido humano de pacientes com epilepsia, bem como comparando grupos de epilepsia por esclerose mesial temporal com e sem transtorno psiquiátrico. Esperamos, com nossos achados, contribuir para melhor delimitar os mecanismos serotoninérgicos que podem ser responsáveis pela correlação entre epilepsia e comorbidades psiquiátricas, assim como, com a gravidade da epilepsia.

Objetivo Primário:

Este estudo tem como objetivo primário avaliar se a concentração de serotonina e seus metabólitos, receptores de serotonina e transportadores de serotonina no hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal causada por esclerose mesial temporal (ELT-EMT) e distúrbios psiquiátricos estão diminuídos em comparação com os níveis de serotonina no tecido do hipocampo de pacientes com ELT-EMT sem comorbidades psiquiátricas.

Objetivo Secundário:

O objetivo secundário deste estudo é o de determinar se existe correlação entre níveis de serotonina e as variáveis relacionadas à gravidade da epilepsia.

Metodologia Proposta:

Tecido Humano

Uma amostra do hipocampo do paciente será coletada durante procedimento cirúrgico e congelada a -80° C até análise. O hipocampo será armazenado para análise no Laboratório de Neurociências (LIM 27) no Instituto de Psiquiatria.

Metodologia de HPLC

A serotonina e o 5-metoxitriptamina serão diluídas em uma solução de fosfato de sódio da Merck (Darmstadt, Germany). O dodecil sulfato de sódio será da Aldrich-Sigma (Steinheim, Germany). Ácido Perclórico (HClO₄), metanol e acetonitrila serão obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). A fase móvel será composta por uma mistura de solução ácida (contendo fosfato de sódio 0,1 M e dodecil fosfato de sódio 10µM), acetonitrila e metanol (70:15:15 v/v/v). A fase móvel será ajustada para pH 2,5 com ácido perclórico 37%, filtrada com filtro de 0,45-µm e degaseificada antes do uso. A fase móvel será usada em temperatura ambiente com fluxo de 0,8 ml/min (pressão aproximada de 150 bar). Serão preparados padrões com solução de fosfato de sódio, que armazenados em vials âmbar nas seguintes concentrações: 1mg/mL, 0,1mg/mL, 0,01mg/mL, 0,001mg/mL e 0,0001mg/mL de serotonina. O padrão externo será o 5-metoxitriptamina preparado em uma solução de fosfato de sódio 30mM, pH 7,4 e armazenado em vial âmbar a 4°C.

O tecido cerebral humano será dissecado e homogeneizado com ácido perclórico 3,4M em potter (Potter S, B. Braun da Biotech International®) para uma concentração final de 25mg/ml. Em seguida, sonificado por 30 segundos para lise de membranas (Biotech International®, VirSonic 100 da Virtis®), centrifugado 14000g a 4°C por 20 minutos (Centrifuga Himac CF ISC2 da Hitachi®) e armazenado a -80° C até uso. A cromatografia será realizada pelo sistema Shimadzu. A coluna (250 x 4,0 mm i.d.) será Lichrospher 5 µm 100 C8 (Varian). A detecção será realizada por fluorescência (Shimadzu) ajustada em 330 nm para excitação e 450nm para emissão.

Para a curva de calibração serão utilizado 200µL de ácido perclórico, também utilizado para homogeneizar o tecido cerebral humano e,

APÊNDICE 1. INFORMAÇÕES BÁSICAS DE SUBMISSÃO NA PLATAFORMA BRASIL

o qual é livre de substâncias potencialmente interferentes no comportamento da serotonina. As soluções padrões serão preparadas semanalmente. A metodologia de quantificação de serotonina foi desenvolvida baseada em protocolos previamente estabelecidos pelo grupo em plaquetas humanas e em estudos prévios da literatura (Alvarez et al 1999, Baumann et al 1998, Nogushi et al 2000, Umeda et al 2004).

Metodologia: Western Blot

O tecido cerebral humano, já dissecado e armazenado, será homogeneizado em solução de lise celular para análise por Western Blot, associado a uma solução inibidora de protease, com uma concentração final de tecido de 200mg de tecido wt/ml. A concentração da proteína na amostra será determinada usando o procedimento de Bradford. Todas as amostras serão submetidas à eletroforese em gel. Terminando-se a eletroforese, o gel será colocado em contato direto com uma membrana de nitrocelulose, e as proteínas contidas no gel serão transferidas para a membrana, por uma nova corrente elétrica, para que a proteína de interesse possa ser detectada após incubações com anticorpos específicos e compostos fluorescentes. As membranas serão incubadas com os anticorpos de interesse (anticorpo anti-transportador de serotonina, anti-receptor 5HT1A, anti-receptor 5HT1B, anti-receptor 5HT2A, anti-receptor 5HT4, anti-receptor 5HT7) e para β -actina.

Critério de Inclusão:

Análise de Hipocampo ressecados cirurgicamente por epilepsia do lobo temporal decorrente de esclerose mesial temporal refratária ao tratamento medicamentoso. A amostra do hipocampo será obtida dos pacientes que serão submetidos a procedimento neurocirúrgico padrão com lobectomia temporal anterior.

Critério de Exclusão:

Os critérios de exclusão são os hipocampus de pacientes com: 1. Idade menor de 18 anos; 2. Deficiência mental e 3. Não consentimento na pesquisa após a apresentação do termo de consentimento livre e esclarecido.

Serão ainda excluídas as amostras de tecido humano que não sejam suficientes para análise após o procedimento cirúrgico.

Riscos:

Não há riscos para o paciente.

Benefícios:

Não há benefícios diretos para o paciente.

Metodologia de Análise de Dados:

A correlação entre 5HT e as variáveis contínuas será medida através da correlação de Pearson. Comparação entre as variáveis de grupo (sexo, frequência das crises, presença de crises febris e estado de mal epilético, presença e frequência de crises tônico-clônico generalizadas, presença tipo de transtornos psiquiátricos) será avaliada pelo teste T Student ou ANOVA dependendo do número do grupo. Normalidade das variáveis serão verificados por Q-Q plots. Tipo I de erro foi estabelecido em 5% e todos os testes foram bicaudais. As análises serão conduzidas no SPSS v14.

Desfecho Primário:

Análise e mensuração da concentração de serotonina, receptores serotoninérgicos e transportador no hipocampo de pacientes com epilepsia refratária; e

Correlação de variáveis clínicas com a atividade serotoninérgica

Tamanho da Amostra no Brasil: 40

Países de Recrutamento

País de Origem do Estudo	País	Nº de participantes da pesquisa
Sim	BRASIL	40

APÊNDICE 1. INFORMAÇÕES BÁSICAS DE SUBMISSÃO NA PLATAFORMA BRASIL

Outras Informações

Haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc)?

Não

Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa:

40

Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro

ID Grupo	Nº de Indivíduos	Intervenções a serem realizadas
Hipocampo de Pacientes Epilepsia do Lobo Temporal	40	Dosagem da concentração de serotonina e metabólitos

O Estudo é Multicêntrico no Brasil?

Não

Propõe dispensa do TCLE?

Não

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Não

Cronograma de Execução

Identificação da Etapa	Início (DD/MM/AAAA)	Término (DD/MM/AAAA)
Pesquisa bibliográfica	01/02/2016	02/03/2016
Coleta de dados e material	01/03/2016	01/03/2017
Avaliação do material coletado	04/07/2016	02/09/2017

Orçamento Financeiro

Identificação de Orçamento	Tipo	Valor em Reais (R\$)
Material de consumo + material permanente	Capital	R\$ 39.243,20
Total em R\$		R\$ 39.243,20

Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisador:

O Projeto será submetido à Agência Financiadora de Pesquisa para subsídio após aprovação do Comitê de Ética desta Instituição

Bibliografia:

Albano C, Cupello A, Mainardi P, Scarrone S, Favale E (2006) Successful treatment of epilepsy with serotonin reuptake inhibitors: proposed mechanism. *Neurochemical Research* 31: 509-514
 Alvarez JC, Bothua D, Collignon I, Advenier C, Spreux-Varoquaux O (1999) Simultaneous measurement of dopamine, serotonin, their metabolites and tryptophan in mouse brain homogenates by high-performance liquid chromatography with dual coulometric detection. *Biomedical Chromatography* 13: 293-298
 Anhoury S, Brown RJ, Krishnamoorthy ES, Trimble MR (2000) Psychiatric outcome after temporal lobectomy: a predictive study. *Epilepsia* 41:1808-1815
 Aydemir N, Özkara Ç, Canbeyli R, Tekcan A (2004) Changes in quality of life and self-perspective related to surgery in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy and Behavior* 5(5): 735-742
 Bagdy G, Keoskemeti V, Riba P, Jakus R (2007) Serotonin and epilepsy. *Journal of Neurochemistry* 100: 857-873
 Baumann MH, Ayestas MA, Rothman RB (1988) Functional Consequences of Central Serotonin Depletion Produced by Repeated Fenfluramine Administration in Rats. *The Journal of Neuroscience* 18(21):9089-9077
 Beleza P (2009) Refractory epilepsy: a clinically oriented review. *European Neurology* 62: 65-71
 Bortolozzi A, Díaz-Mataix L, Soorza MC, Artigas PCF (2005) The activation of 5HT2A receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *Journal of Neurochemistry* 95: 1597-1607
 Briellmann R, Hopwood MJ, Jackson GD (2007) Major depression in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: clinical and imaging correlates. *Journal of Neurology and Neurosurgical Psychiatry* 78: 1226-1230
 Carr G, Lucki I (2011) The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. *Psychopharmacology* 213: 265-287
 Cheetam SC, Crompton MR, Katona CL, Horton RW (1990) brain 5-HT1 binding of 3H-imipramine in brain and platelets and its relevance to the biochemistry of affective disorders. *Life Sciences* 29: 211-220
 Ciranna L (2006) Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. *Currents in Neuropharmacology* 4: 101-114
 Clough RW, Peterson BR, Steenberg JL, Jobe PC, Fells JB, Browning RA, Mishra PK (1998) Neurite extension of developing neuroadrenergic neurons is impaired in genetically epilepsy-prone rats (GEPR-3s): an in vitro study in locus coeruleus. *Epilepsy Research* 29: 135-146
 Dailey JW, Mishra PK, Ko KH, Penny JE, Jobe PC (1992) Serotonergic abnormalities in the central nervous system of seizure-naïve genetically epilepsy-prone rats. *Life Sciences* 50: 319-326
 Dailey JW, Yan Q-S, Adams-Curtis LE, Ryu JR, Ko KH, Mishra PK, Jobe PC (1995) Neurochemical correlates of antiepileptic drugs in the genetically epilepsy-prone rat (GEPR). *Life Sciences* 58(4): 259-268
 Daws LC, Gould GG (2011) Ontogeny and regulation of the serotonin transporter: Providing insights into human disorders. *Pharmacology & Therapeutics* 131: 61-79
 DiAlessio L, Iagante B, Papayannis C, Oddo S, Silva W, Solis P, Donoli V, Kauffman M, Consalvo D, Zieher LM, Kochen S (2009) Psychotic disorders in Argentine patients with refractory temporal lobe epilepsy: a case-control study. *Epilepsy and Behavior* 14(4): 604-609
 Drevets WC, Frank E, Price J, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, Huang Y, Gautier C, Mathis C (1999) Biological Psychiatry 46: 1375-1387
 Engel JJ, McDermott MP, Wiebe S, Langfitt JT, Stern JM, Dewar S, Gardiner I, Erba G, Fried I, Jacobs M, Vinters HV, Mintzer S, Kieburz K. (2012) Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a

APÊNDICE 1. INFORMAÇÕES BÁSICAS DE SUBMISSÃO NA PLATAFORMA BRASIL

randomized trial. *The Journal of American Medical Association* 307 (9): 922-930 Favale E, Rubino V, Mainardi P, Lunardi G, Albano C (1995) Anticonvulsant effect of fluoxetine in humans. *Neurology* 45(10): 1926-1927 Feng J, Cai X, Zhao J, Yan Z (2001) Serotonin receptors modulate GABA A receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. *The Journal of Neuroscience* 21(17): 6502-6511 Forsgren L, Nyström L (1990) An incident case-referent study of epileptic seizures in adults. *Epilepsy Research* 6(1):66-81 García-Morales I, Mayor PP, Kanner AM (2008) Psychiatric Comorbidities in Epilepsy: Identification and Treatment. *The Neurologist* 14(8S): S15-S26 Gonçalves EB, Cendes F (2011) Depression in patients with refractory temporal lobe epilepsy. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 69 (5): 775-777 Hasler G, Bornwetsch R, Giovachinni G, Toczek MT, Bagic A, Luckenbaugh DA, Drevets WC, Theodore WH (2007) 5HT1A Receptor binding in temporal lobe epilepsy patients with and without major depression. *Biological Psychiatry* 62: 1258-1264 Hesdorffer DC, Hauser WA, Olafsson E, Olafsson E, Ludvigsson P, Kjartansson O (2006) Depression and suicidal attempt as risk factor for incidental unprovoked seizures *Annals of Neurology* 59:35-41. Hesdorffer DC, Hauser WA, Annegers JF, Cascino G (2000) Major depression is a risk factor for seizures in older adults. *Annals of Neurology* 47:246-249 Hrnjova Heilmovic, Santos J, Gilliam F, Kanner AM. Neuroanatomical and Neurobiological Bases of Psychiatric Disorders em Ettinger, AB, Kanner, A (2001) Psychiatric Issues in Epilepsy: A Practical Guide to Diagnosis and Treatment Editora Lippincott: 93-118 Huang Y, Xu H, Li H, Yang H, Chen Y, Shi X (2012) Pre-gestational stress reduces the ratio of 5-HIAA to 5-HT and the expression of 5-HT1A receptor and serotonin transporter in the brain of foetal rat. *Neuroscience* 13(22) Jobe PC, Browning RA (2005) the serotonergic and noradrenergic effects of antidepressant drugs are anticonvulsant, not proconvulsant. *Epilepsy and Behavior* 7: 602-619 Jobe PC, Dailey JW (2000) Genetically Epilepsy-Prone Rats (GEPRs) in Drug Research. *CNS Drug Reviews* 6(3): 241-260 Kalia M (2005) Neurobiological basis of depression: an update. *Metabolism* 54(5 S1):24-7 Kanner AM (2005) Depression in Epilepsy: a neurobiologic perspective. *Epilepsy Currents* 5(1): 21-27 Kanner A (2008) Depression in epilepsy: a complex relation with unexpected consequences. *Current Opinion in Neurology* 21: 190-194 Kanner A (2009) Depression and epilepsy: a review of multiple facets of their close relation. *Neurologic Clinics* 27: 865-880 Kanner AM (2011) Depression and epilepsy: a bidirectional relation? *Epilepsia* 52(S1): 21-27 Kim SW, Shin IS, Kim JM, Youn T, Yang SJ, Hwang MY, Yoon JS (2009) The 5HT2 receptor profiles of antipsychotics in pathogenesis of obsessive-compulsive symptoms in schizophrenia. *Clinical Neuropharmacology* 32(4): 224-228 Klemmensen K, Gordon N JA, David DJ, Hen R, Gross CT (2006) Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT1A receptor. *Neuropsychopharmacology* 31: 101-111 Leopoldo M, Lacivita E, Berardi F, Perrone R, Hedlund PB (2011) Serotonin 5-HT7 receptor agents: structure-activity relationships and potential therapeutic application in central nervous system disorders. *Pharmacology & Therapeutics* 129: 120-148 Lothe A, Didelez A, Hammers A, Costes N, Saoud M, Gilliam F, Ryylin P (2008) Comorbidity between temporal lobe epilepsy and depression: a [18F] MPPF PET study. *Brain* 131: 2765-2782 Lucas G, Rymar VV, Du J, Mnie-Filali O, Bisgaard C, Manta S, Lambas-Senas L, Wiborg O, Haddjeri N, Pifeyro G, Sadikot AF, Debonnel G (2007) Serotonin4 (5HT4) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron* 55: 712-725 Lundberg J, Tiger M, Lande:n M, Haldin C, Farde L (2012) Serotonin transporter occupancy with TCAs and SSRIs: a PET study in patients with major depressive disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 1-6 Mazarati A, Siddarth P, Baldwin RA, Shin D, Caplan R, Sankar R (2008) Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine. *Brain* 131(Pt 8):2071-83. Merrill MA, Clough RW, Dailey JW, Jobe PC, Browning RA (2007) Localization of the serotonergic terminal fields modulating seizures in the genetically epilepsy-prone rat. *Epilepsy Research* 76: 93-102 Mnie-Filali O, Lambas-Senas L, Zimmer L, Haddjeri N (2007) 5-HT7 receptor antagonists as a new class of antidepressants. *Drug News Perspect* 20: 613-618 Nogushi K, Watanabe T, Higuchi S, Chiba K (2000) Determination of YM902, a novel selective serotonin reuptake inhibitor, in rat and dog plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomedical Chromatography* 14: 269-273 Parrot S, Lamás-Senas L, Sentenac S, Denoroy L, Renaud B (2007) Highly sensitive assay for the measurement of serotonin in microdialysates using capillary high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* 850: 303-309 Pineda E, Shin D, Raman Sankar R, Mazarati MA (2010) Comorbidity between epilepsy and depression: Experimental evidence for the involvement of serotonergic, glucocorticoid, and neuroinflammatory mechanisms *Epilepsia*, 51(S. 3): 110-114 Pugh MJV, Copeland LA, Zeber JE, Cramer JA, Amuan ME (2005) The impact of epilepsy on health status among Younger and Older Adults. *Epilepsia*, 46(11):1820-1827 Pytlak M, Vargová V, Mechírová V, Feiščák M (2009) Serotonin Receptors - From molecular biology to clinical applications. *Physiologic Research* 60: 15-26. Ryu JR, Jobe PC, Milbrandt JC, Mishra PK, Clough RW, Browning RA, Dailey JW, Seo DO, Ko KH (1999) Morphological deficits in noradrenergic neurons in GEPR-9s stem from abnormalities in both the locus coeruleus and its target tissues. *Experimental Neurology* 156: 84-91 Sagher O, Thawani JO, Etame AB, Gomez-hassan DM (2012) Seizure outcomes and mesial resection volumes following selective amygdalohippocampectomy and temporal lobectomy. *Neurosurgical Focus* 32(3): E8 Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, Gunn RN, Grasby PM, Cowen PJ (2000) Brain serotonin 1A receptor binding measured by positron emission tomography with [11C]WAY-100635 *Archives Gen Psychiatry* 57: 174-180 Savio I, Lindstrom P, Gulyas B, Haldin C, Andree B, Farde L (2004) Limbic reductions of 5HT1A receptor binding in human temporal lobe epilepsy. *Neurology* 62: 1343-1351 Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, Rajkowska G (1998) Increase in serotonin 1^a autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression- post mortem evidence for decreased serotonin activity. *Journal of Neuroscience* 18: 7384-7401 Talib LL, Joaquim HPG, de Paula VJR (2011) Metodologia em Neuroquímica in Clínica Psiquiátrica. Editora Manole volume 2: 2048-2058 Toczek MT, Carson RE, Lang L, Ma Y, Spanali MV, Der MG, Fazilat S, Herscovitch P, Eckelman WC, Theodore WH (2003) Pet imaging of 5HT1A receptor binding in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 60(5): 749-758 Tripathi M, Uma PP, Vibha D, Bhatia R, Srivastana MVP, Singh MB, Kameshwar P, Chandra SP (2011) Predictors of refractory epilepsy in North India: a case control study. *Seizure* 20: 779-783 Umeda S, Stagliano GW, Borenstein MR, Raffa RB (2004) A reverse-phase HPLC and fluorescence detection method for measurement of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in Plasma. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51:73-76 Veriano Jr A, Capovilla G, Fattore C, Franco V, Gambardella A, Guerrini R, La Briola F, Ladogana M, Rosati E, Specchio LM, Striano S, Perucca E (2010) Characteristics of a large population of patients with refractory epilepsy attending tertiary referral centers in Italy. *Epilepsia* 51(5): 921-925 Xiaoying W, Baumann MH, Xu Heng, Rothman RB (2004) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) administration to rat decreases brain tissue serotonin but not serotonin transporter protein and glial fibrillary acidic protein. *Synapse* 53: 240-248 Wang HT, Han F, Shi YX (2009) Activity of the 5-HT1A receptor is involved in the alteration of glucocorticoid receptor in hippocampus and corticotropin-releasing factor in hypothalamus in SPS rats. *International Journal Molecular Medicine* 24: 227-231, Witkin JM, Baez M, Yu J, Barton ME, Shannon HE (2007) Constitutive deletion of the serotonin-7 (5HT7) receptor decreases electrical and chemical seizure thresholds. *Epilepsy Research* 75: 39-45 Yan Q-S, Jobe PC, Dailey JW (1995) Further evidence of anticonvulsant role of 5-hydroxytryptamine in genetically epilepsy-prone rats. *British Journal of Pharmacology* 115(7):1314-1318

Upload de Documentos

Arquivo Anexos:

Tipo	Arquivo
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_13456.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc
Outros	Anuência.pdf
Orçamento	Orçamento.xls
Outros	Formulário.pdf

Data de Submissão do Projeto: 19/09/2016

Nome do Arquivo: PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_771917_E1.pdf

Versão do Projeto: 2

APÊNDICE 1. INFORMAÇÕES BÁSICAS DE SUBMISSÃO NA PLATAFORMA BRASIL

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc
Declaração de Pesquisadores	Carta_Pesquisadora_Responsavel.pdf
Outros	Formulario_Emenda_Folha1.pdf
Outros	Formulario_Emenda_Folha2.pdf
Outros	Formulario_Emenda_Folha3.pdf

Finalizar

Manter sigilo da íntegra do projeto de pesquisa: ☐ Não

Justificativa da Emenda:

Adição de pesquisador membro nas informações preliminares do projetos. O pesquisador já havia sido referido como pesquisador membro executante no formulário on-line. Não foi modificado o termo de consentimento livre esclarecido, pois não haverá modificações na seleção e contato com o paciente, também não oferecendo nenhum risco adicional ao paciente. Anexado Carta do pesquisador responsável e formulário de emenda da CAPESQ (esta última em 3 folhas em separado).

APÊNDICE 2. PARECER DE APRECIÇÃO DO CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade serotoninérgica no hipocampo de pacientes com epilepsia de lobo temporal

Pesquisador: Kette Dualibi Ramos Valente

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56797513.4.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.633.093

Apresentação do Projeto:

Entre os indivíduos com epilepsia do lobo temporal (ELT) causada por esclerose mesial temporal (EMT), a incidência de depressão é maior do que entre aqueles com epilepsia do lobo temporal por outras causas. Estudos usando modelos animais e imagem funcional em humanos sugerem a existência de um mecanismo serotoninérgico comum.

Esse estudo objetiva a avaliação da concentração de serotonina (5HT) no hipocampo dos pacientes com ELT-EMT, que forem submetidos à cirurgia devido à presença de epilepsia refratária. Os pesquisadores se propõem a avaliar a afinidade de ligação dos receptores e transmissor serotoninérgicos no hipocampo destes mesmos pacientes e correlacionar estes dados com a presença de comorbidades psiquiátricas e outras variáveis clínicas da epilepsia indicadores de gravidade. Para estes objetivos, serão avaliadas as amostras de hipocampus de pacientes cirurgicamente tratados para ELT por EMT após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A concentração de 5HT será medida através de high-performance liquid chromatography (HPLC) com detecção por fluorescência. Os receptores e transmissor de serotonina serão avaliados por Western Blot.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

APÊNDICE 2. PARECER DE APRECIÇÃO DO CEP

Continuação do Parecer: 1.633.093

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Este estudo tem como objetivo primário avaliar se a concentração de serotonina e seus metabólitos, receptores de serotonina e transportadores de serotonina no hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal causada por esclerose mesial temporal (ELT-EMT) e distúrbios psiquiátricos estão diminuídos em comparação com os níveis de serotonina no tecido do hipocampo de pacientes com ELT-EMT sem comorbidades psiquiátricas.

Objetivo Secundário:

O objetivo secundário deste estudo é o de determinar se existe correlação entre níveis de serotonina e as variáveis relacionadas à gravidade da epilepsia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O presente estudo utilizará amostra biológica coletada durante ato cirúrgico já programado para tratamento de paciente epilepsia refratária. Análise de Hipocampo ressecados cirurgicamente por epilepsia do lobo temporal decorrente de esclerose mesial temporal refratária ao tratamento medicamentoso. A amostra do hipocampo será obtida dos pacientes que serão submetidos a procedimento neurocirúrgico padrão com lobectomia temporal anterior. Segundo o protocolo a indicação cirúrgica será clínica e independente do estudo em questão.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto com objetivos bem definidos e metodologia adequadas aos objetivos propostos. O material biológico ficará armazenado no LIM27 onde será feita as análises propostas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE escrito em linguagem clara e compreensível.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

APÊNDICE 2. PARECER DE APRECIÇÃO DO CEP

Continuação do Parecer: 1.633.093

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 189437.pdf	07/06/2016 12:30:32		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	07/06/2016 12:29:08	Kette Dualibi Ramos Valente	Aceito
Outros	Formulario.pdf	30/03/2016 12:01:51	Kette Dualibi Ramos Valente	Aceito
Orçamento	Orcamento.xls	29/01/2016 12:59:37	Kette Dualibi Ramos Valente	Aceito
Outros	Anuencia.pdf	29/01/2016 12:58:47	Kette Dualibi Ramos Valente	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	08/01/2016 09:39:29	Kette Dualibi Ramos Valente	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_13456.pdf	08/01/2016 09:34:58	Kette Dualibi Ramos Valente	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 12 de Julho de 2016

Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br