Juliana Andrade Alcantara

O estudo de polimorfismos da via dopaminérgica na epilepsia do
lobo temporal causada por esclerose hipocampal

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientadora: Profa. Dra. Kette Dualibi
Ramos Valente

São Paulo

2017

Juliana Andrade Alcantara

O estudo de polimorfismos da via dopaminérgica na epilepsia do
lobo temporal causada por esclerose hipocampal

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientadora: Profa. Dra. Kette Dualibi
Ramos Valente

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Alcantara, Juliana Andrade

O estudo de polimorfismos da via dopaminérgica na epilepsia do lobo temporal causada por esclerose hipocampal / Juliana Andrade Alcantara. -- São Paulo, 2017.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Psiquiatria.

Orientadora: Kette Dualibi Ramos Valente.

Descritores: 1.Epilepsia do lobo temporal 2.Dopamina 3.Fator neurotrófico derivado do encéfalo 4.Receptores dopaminérgicos 5.Polimorfismo genético 6.Hipocampo

USP/FM/DBD-364/17

Aos meus pais, Tereza e Celso e minha irmã Ludmyla.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Kette Dualibi Ramos Valente, minha orientadora, pesquisadora dedicada e exemplo de competência, obrigada por compartilhar seu enorme conhecimento científico e sobre a vida.

À Dra. Silvia de Vincentiis, que sempre esteve ao meu lado nessa longa trajetória, pelas inúmeras discussões científicas, por sua ajuda, generosidade e carinho. A todo o grupo de estudo – Epilepsia e Transtornos Psiquiátricos - IPQ-HCFMUSP pelo apoio constante e à Dra. Renata Demarque, pelo companheirismo no ambulatório e por compartilhar seu conhecimento sobre Psiquiatria.

Ao Prof. Dr. Daniel S. Kerr, meu grande mestre, com muita paciência e competência me orientou na rotina laboratorial, muito obrigada por tudo. A todos os funcionários e alunos do Laboratório LIM-27 onde tive o prazer de desenvolver esse trabalho.

À Dra. Vanessa de Jesus Rodrigues de Paula, pelo seu entusiasmo e amor pela ciência. Obrigada por sempre compartilhar o melhor de você, por toda ajuda, colaboração, disponibilidade e, sobretudo pela sua amizade.

Ao Giancarlo Cardillo, Gabriel Polho, Stephanie Saloio e Mariana Melo, pela companhia e por tornar nossa árdua rotina laboratorial mais leve e divertida. Ao Stefani, por me ouvir e apoiar. À querida Cyntia Fioratti, por tornar o pós-laboratório os melhores momentos da pós-graduação.

À Enf. Jouce Gabriela, meu maior exemplo profissional do exercício da Enfermagem, por todas as conversas e ensinamentos.

À Dra. Thais Chile, pela generosidade. Ao Bernardo dos Santos, pela colaboração na análise estatística deste estudo.

À Célia, Marly e Michelle pela paciência e carinho de todas as terças-feiras no Laboratório de Neurofisiologia Clínica, vocês são incríveis.

À Isabel Ataíde e Eliza Fukushima, secretárias da pós-graduação, por todo apoio administrativo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro.

A todos os voluntários deste estudo, que doaram seu sangue e suas esperanças à ciência.

A toda minha família e amigos pelo apoio incondicional. Ao Paulo das Neves por me encorajar e ajudar chegar até aqui.

“A persistência é o menor caminho do êxito”. (Charles Chaplin)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as normas em vigor no momento desta 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 dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
1.1 Epilepsia.....	1
1.1.1 Conceito.....	1
1.2 Epidemiologia.....	1
1.2.1 Incidência.....	2
1.2.2 Prevalência.....	2
1.3 Epilepsia do lobo temporal causada por esclerose hipocampal.....	2
1.3.1 Histopatologia.....	3
1.3.2 Classificação da esclerose hipocampal.....	4
1.4 Diagnóstico da epilepsia do lobo temporal causada por esclerose hipocampal.....	5
1.4.1 Sinais e sintomas.....	5
1.4.2 Aspectos eletroencefalográficos.....	7
1.4.3 Aspectos de neuroimagem.....	8
1.5 Tratamento.....	9
1.6 O sistema dopaminérgico.....	9

1.7 Relevância da dopamina na epileptogênese.....	10
1.8 Relevância dos receptores dopaminérgicos na epileptogênese.....	12
1.9 Polimorfismos relacionados ao sistema dopaminérgico.....	14
1.9.1 Genes relacionados aos receptores de dopamina.....	15
1.9.1.1 Polimorfismo do gene do receptor dopaminérgico DRD2	
Polimorfismo TaqI A do DRD2 - rs 1800497.....	15
1.9.1.2 Polimorfismo do gene do receptor dopaminérgico DRD4	
Polimorfismo DRD4 - VNTR.....	16
1.9.1.3 Polimorfismo do gene do receptor dopaminérgico DRD4	
Polimorfismo DRD4 - SNP rs1800955.....	16
1.10 Genes relacionados ao transportador dopaminérgico - DAT.....	17
1.10.1 Gene DAT.....	17
1.10.2 Polimorfismo da região 3' não-traduzida (UTR) -	
3'UTR.....	17
1.10.3 Polimorfismo da região Intron 8 do gene DAT - Intron 8.....	18
1.11 Genes relacionados aos metabolizadores dopaminérgicos	18
1.11.1 Polimorfismo relacionado à monoamino oxidase A - MAOA.....	18
1.11.2 Polimorfismo relacionado à Catecol O-Metiltransferase - COMT....	19
1.12 <i>BDNF</i> - <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>	19
1.12.1 <i>BDNF</i> relacionado a epileptogênese.....	20
1.12.2 Polimorfismo Val66Met do <i>BDNF</i> e epileptogênese.....	20
2. Justificativa.....	22
3. Objetivo.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23

3.2 Objetivos específicos.....	23
4. Métodos.....	25
4.1 Participantes.....	25
4.1.1 Critérios de inclusão.....	25
4.1.2 Critérios de exclusão.....	26
4.1.3 Caracterização dos pacientes com epilepsia do lobo temporal causada por esclerose hipocampal.....	26
4.1.4 Voluntários saudáveis.....	30
4.1.5 Instrumentos clínicos.....	30
4.2 Genotipagem.....	30
4.2.1 Métodos de amplificação para polimorfismos do tipo SNP.....	31
4.2.1.1 Polimorfismo do receptor DRD2 (DRD2 TAQL A rs1800497).....	31
4.2.1.2 Polimorfismo do receptor DRD4 (DRD4 rs1800955).....	33
4.2.1.3 Polimorfismo da COMT (COMT_rs4680).....	34
4.2.1.4 Polimorfismo do BDNF (BDNF_rs6265).....	35
4.3 Protocolo de ciclagem para discriminação alélica dos polimorfismos do tipo SNP.....	36
4.4 Método de amplificação para polimorfismos do tipo VNTR.....	37
4.4.1 Polimorfismo do 3'UTR do gene DAT.....	37
4.4.2 Polimorfismo do Intron 8 do gene DAT.....	39
4.4.3 Polimorfismo da MAOA.....	40
4.4.4 Polimorfismo do DRD4 VNTR.....	42
4.5 Análise estatística.....	44
4.5.1 Análise de haplótipos.....	44

4.5.2 Cálculo do poder amostral.....	44
5. Resultados.....	46
5.1 Polimorfismos dos receptores dopaminérgicos.....	46
5.2 Polimorfismos dos metabolizadores da dopamina.....	47
5.3 Polimorfismos relacionados ao gene DAT.....	48
5.4 Polimorfismos haplótipos do gene DAT - 3'UTR e Intron 8.....	49
5.5 Polimorfismo Val66Met do gene BDNF.....	50
6. Discussão.....	52
6.1 Polimorfismo do DAT.....	53
6.2 Haplótipos do gene DAT.....	54
6.3 Receptores dopaminérgicos.....	54
6.4 Metabolizadores da dopamina - COMT e MAOA.....	55
6.5 BDNF.....	56
6.6 Limitações do estudo.....	57
7. Conclusão.....	59
8. Referências bibliográficas.....	60

LISTA DE SIGLAS

A	Adenina
AC	Adenil Ciclase
AD	aldeído desidrogenase
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic fator</i>
C	Citosina
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CPF	Córtex pré-frontal
CTCG	Crise tônico-clônico generalizada
D1	Receptor dopaminérgico D1
D2	Receptor dopaminérgico D2
D3	Receptor dopaminérgico D3
D4	Receptor dopaminérgico D4
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
dATP	Desoxadenosina trifosfato com base adenosina
DBH	<i>DA-β-hydroxylase</i>
dCTP	Desoxadenosina trifosfato com base citosina
dGTP	Desoxadenosina trifosfato com base guanina
DL	Desequilíbrio de ligação
DMSO	Dimetilsulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DOPAC	Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético
DP	Diferença padrão
DRD1	Gene codificador do receptor dopaminérgico subtipo 1
DRD2	Gene codificador do receptor dopaminérgico subtipo 2
DRD3	Gene codificador do receptor dopaminérgico subtipo 3
DRD4	Gene codificador do receptor dopaminérgico subtipo 4
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual</i>
dTTP	Desoxadenosina trifosfato com base timina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EEG	Eletroencefalograma
EGGD	Epilepsias generalizadas geneticamente determinadas
EH	Esclerose Hipocampal
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
ELT-EH	Epilepsia do Lobo Temporal com esclerose hipocampal
FAE	Fármaco antiepiléptico
G	Guanina
HVA	Ácido homovanílico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
L	Longo
LEV	Levetiracetam
MAO	Monoamina oxidase
MAOA	Monoamino oxidase A
MAOA-	Polimorfismo na região 5 não traduzida do gene da MAO

Máx	Máximo
Met	Metionina
Min	Minimo
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NTs	Neurotrofinas
PCR	Reação em cadeia polimerase
PET	<i>Positron emission tomography</i>
RM	Ressonância Magnética
rs	<i>Referência para SNP</i>
S	<i>Short</i>
SCID I	<i>Structured Clinical Interview Disorders</i>
SLC6A3	<i>Solute Carrier Family 6, member 3</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SPECT	<i>Single photon emission computerized tomography</i>
T	Timina
TrisHCl	<i>Hidroximetil aminometano hidrocloreto</i>
UTR	Não codificador
Val	Valina
VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i>
m-BDNF	BDNF maduro
[18F]	Fluorodopa
3'UTR	Região 3 não traduzida do gene DAT
5HT	Serotonina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
μ	Micro
μM	Micromol
pH	Potencial hidrogeniônico
NaCl	Cloreto de sódio
pMol	Picomol
ml	Mililitros
mM	Micro molar
kb	Quilobyte
MgCl	Cloreto de magnésio
Ng	Nanograma
U	Unidade

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Característica histopatológica da Esclerose de Hipocampo.....	3
FIGURA 2- Classificação da Esclerose de Hipocampo.....	4
FIGURA 3- Eletroencefalograma compatível com ELT-EH.....	7
FIGURA 4- Eletroencefalograma compatível com ELT-EH.....	7
FIGURA 5- Ressonância Magnética em sequência T2, com hipersinal de hipocampo ipsilateral compatível com EH.....	8
FIGURA 6- Representação da amplificação do polimorfismo do receptor D2 (DRD2 TAQ rs1800497). Alelo - T.....	32
FIGURA 7- Representação da amplificação do polimorfismo do receptor D2 DRD2 TAQ rs1800497). Alelo – C.....	32
FIGURA 8- Representação da amplificação do polimorfismo do receptor D2 (DRD2/ANKK1 TAQ rs1800497). Alelos CT.....	32
FIGURA 9- Representação da amplificação do polimorfismo do receptor D4 (DRD4 rs1800955). Alelo – T.....	33
FIGURA 10- Representação da amplificação do polimorfismo do receptor D4 (DRD4 rs1800955). Alelo - C.....	33
FIGURA 11- Representação da amplificação do polimorfismo do receptor D4 (DRD4 rs1800955). Alelos CT.....	34
FIGURA 12- Representação da amplificação do polimorfismo COMT (rs4680). Alelo - A.....	34
FIGURA 13- Representação da amplificação do polimorfismo COMT (rs4680). Alelo - G.....	34

FIGURA 14- Representação da amplificação do polimorfismo COMT (rs4680). Alelo AG.....	35
FIGURA 15- Representação da amplificação do polimorfismo BDNF Val66Met (rs6265). Alelo - A.....	36
FIGURA 16- Representação da amplificação do polimorfismo BDNF Val66Met (rs6265). Alelo - G.....	36
FIGURA 17- Representação da amplificação do polimorfismo BDNF Val66Met (rs6265). Alelos - AG.....	36
FIGURA 18- Representação do gel virtual da amplificação do polimorfismos 3'UTR <i>VNTR</i>	38
FIGURA 19- Representação da amplificação do polimorfismo 3'UTR <i>VNTR</i>	38
FIGURA 20- Representação do gel virtual da amplificação do polimorfismos Intron 8 <i>VNTR</i>	39
FIGURA 21- Representação da amplificação do polimorfismo Intron 8 <i>VNTR</i>	40
FIGURA 22- Representação do gel virtual da amplificação do polimorfismos MAOA_ <i>uVNTR</i>	41
FIGURA 23- Representação da amplificação do polimorfismo MAOA_ <i>uVNTR</i>	41
FIGURA 24- Representação do gel virtual da amplificação do polimorfismo DRD4 <i>VNTR</i>	43
FIGURA 25- Representação da amplificação do polimorfismo DRD4 <i>VNTR</i>	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Variáveis demográficas.....	28
Tabela 2- Variáveis clínicas da ELT - EH.....	29
Tabela 3- Distribuição genotípica dos polimorfismos dos receptores dopaminérgicos.....	47
Tabela 4- Distribuição genotípica dos polimorfismos metabolizadores da dopamina.....	48
Tabela 5- Distribuição genotípica dos polimorfismos relacionados ao DAT.....	49
Tabela 6- Distribuição em frequência dos haplótipos dos polimorfismos do gene DAT - 3'UTR e Intron 8.....	50
Tabela 7- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo Val66Met.....	51

RESUMO

Alcantara JA. **O estudo de polimorfismos da via dopaminérgica na epilepsia do lobo temporal causada por esclerose hipocampal** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Estudos clínicos nos pacientes com epilepsia mostram a importância da neurotransmissão modulada pela dopamina na epilepsia. Múltiplos fatores genéticos predisõem à epilepsia e há evidências de uma relação direta entre a epilepsia e as variações nos genes que codificam proteínas envolvidas na neurotransmissão dopaminérgica. O objetivo do nosso estudo foi investigar se os polimorfismos da via dopaminérgica e o Val66Met do BDNF estavam associados à ocorrência de epilepsia do lobo temporal causada por esclerose hipocampal. Para este fim, avaliamos 119 pacientes com epilepsia do lobo temporal causada por esclerose hipocampal e 113 voluntários saudáveis. Os participantes foram genotipados para os polimorfismos do gene DAT (3'UTR e Intron 8), receptores dopaminérgicos (DRD2 e DRD4), COMT, MAO e BDNF (Val66Met). Não houve diferença entre pacientes e controles para os polimorfismos relacionados ao DAT, Intron 8 *VNTR* ($p = 0,395$) e 3'UTR *VNTR* ($p = 0,614$) e para a análise dos haplótipos (3'UTR e Intron 8) ($p = 0,205$). Não houve diferença entre pacientes e controles para os polimorfismos dos receptores dopaminérgicos DRD2 rs1800497 ($p = 0,440$), DRD4 rs1800955 ($p = 0,548$) e DRD4 *VNTR* ($p = 0,318$). Não observamos diferença entre pacientes e controles quanto aos polimorfismos COMT rs4680 ($p = 0,482$) e MAOA_uVNTR ($p = 0,753$), metabolizadores de DA. Não observamos diferença na distribuição genotípica

do polimorfismo Val66Met (rs6265) do BDNF ($p = 0,636$) e a distribuição alélica ($p = 0,471$) no grupo de pacientes com epilepsia do lobo temporal causada por esclerose do hipocampo. Nossos achados demonstraram que os polimorfismos da via dopaminérgica e BDNF Val66Met analisados neste estudo não parecem estar associados à epilepsia de lobo temporal causada por esclerose de hipocampo.

Descritores: epilepsia do lobo temporal; dopamina; fator neurotrófico derivado do encéfalo; receptores dopaminérgicos; polimorfismo genético; hipocampo.

SUMMARY

Alcantara JA. **The study of dopaminergic pathway polymorphisms in temporal lobe epilepsy caused by hippocampal sclerosis** [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Clinical studies in patients with epilepsy showed the role of neurotransmission modulated by dopamine in epilepsy. Multiple genetic factors predispose to epilepsy; there is evidence for a direct relationship between epilepsy and variations in genes encoding proteins involved in dopaminergic neurotransmission. The aim of our study was to investigate if the polymorphism related to the dopaminergic pathway and BDNF polymorphism Val66Met were associated with the occurrence of temporal lobe epilepsy caused by hippocampal sclerosis. We assessed 119 patients with unequivocal temporal lobe epilepsy caused by hippocampal sclerosis and 113 healthy volunteers. Individuals were genotyped for DAT gene polymorphisms (3'UTR and Intron 8), dopaminergic receptors (DRD2 and DRD4), COMT, MAO and BDNF. There was no difference between patients and controls considering the polymorphisms related to DAT, Intron 8 VNTR (p 0,395) and 3'UTR VNTR (p 0.614) and for the analysis of haplotypes (3'UTR and Intron 8) (p 0.205). There was no difference between patients and controls considering the dopaminergic receptor polymorphisms DRD2 rs1800497 (p 0.440), DRD4 rs1800955 (p 0.548) and DRD4 VNTR (p 0.318). We observed no difference between patients and controls regarding COMT polymorphisms rs4680 (p 0.482) and MAOA_uVNTR (p 0.753), of dopaminergic metabolizers. We did not observe difference in the genotypic distribution of BDNF Val66Met polymorphism

(rs6265) ($p = 0.636$) and in the allelic distribution ($p = 0.4711$) in the group with temporal lobe epilepsy caused by hippocampal sclerosis. Our findings suggest that the polymorphisms of the dopaminergic pathway evaluated in this study and BDNF Val66Me do not appear to be associated with temporal lobe epilepsy caused by hippocampal sclerosis.

Descriptors: epilepsy, temporal lobe; dopamine; brain-derived neurotrophic factor; receptors, dopamine; polymorphism, genetic; hippocampus.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Epilepsia*

1.1.1 *Conceito*

A epilepsia é uma condição neurológica crônica caracterizada pela: (1) ocorrência de duas crises não provocadas (ou reflexas) ocorrendo em um intervalo superior a 24 horas, (2) uma crise não provocada (ou reflexa) e uma probabilidade de recorrência de crises similar a um risco de recorrência geral (pelo menos 60%) depois de duas crises não provocadas, ocorrendo nos próximos 10 anos ou (3) o diagnóstico de uma síndrome epilética (Fisher et al., 2014).

A epilepsia é considerada resolvida quando a epilepsia está relacionada à faixa etária (ex. síndromes epiléticas com expressão idade-relacionada) ou naqueles que apresentaram a última crise epilética há 10 anos, sem uso de fármacos antiepiléticos (FAE) há cinco anos (Fisher et al., 2014).

1.2 *Epidemiologia*

A Organização Mundial da Saúde estima que 10% da população mundial terá uma crise convulsiva no decorrer de sua vida. Atualmente, estima-se que aproximadamente 50 milhões de pessoas têm epilepsia, 80% destas pessoas estão nos países de baixa e média renda e 70% respondem ao tratamento. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>, acessado em 16 de julho 2017).

1.2.1 Incidência

Os estudos sobre a incidência de epilepsia na população são escassos. Nos países desenvolvidos, com a incidência ajustada pela idade, esta varia entre 24/100.000 a 53/100.000 pessoas por ano (Hauser et al., 1998).

1.2.2 Prevalência

A prevalência mundial de epilepsia ativa na população fica entre 0,4% e 1% (Sander e Shorvon, 1996). Os fatores de risco externos e relacionados ao meio ambiente, aspectos genéticos e metodologia de pesquisa científica adotada influenciam os dados sobre a prevalência. Estudos em pequena escala, de países em desenvolvimento, demonstraram taxas elevadas de prevalência. Entretanto, nos estudos de larga escala realizados nos países em desenvolvimento, a prevalência é similar à observada nos países desenvolvidos (Placencia e Sander, et al. 1992; Placencia e Shorvon, et al. 1992).

1.3 Epilepsia do lobo temporal causada por esclerose hipocampal

A epilepsia do lobo temporal causada por esclerose hipocampal (ELT-EH) é uma condição neurológica crônica, com a recorrência de crises epiléticas focais originárias do sistema límbico, sendo a causa mais comum de epilepsia focal farmacorresistente nos adultos. A esclerose hipocampal (EH) é a anormalidade histopatológica mais comum nos pacientes com ELT (Berg et al., 2010).

A EH foi relatada pela primeira vez em 1825 (Bouchet et al., 1825) representando a etiologia de 70% dos pacientes referenciados aos centros

terciários com diagnóstico inicial de ELT farmacorresistentes (Cendes et al., 1993). Considerando-se o tratamento cirúrgico das epilepsias, a EH é identificada em 30,5% a 45% de todas as formas de epilepsia e 56% das ELT (Novy et al., 2013). A etiologia da EH é considerada multifatorial, sendo que os estudos retrospectivos têm demonstrado uma alta incidência de possíveis fatores precipitantes na história pregressa, tais como: crises febris, traumas, asfixia neonatal e infecções intracranianas antes dos 5 anos. Acredita-se que estes fatores interajam com fatores inflamatórios e a predisposição genética (Cendes, 2004).

1.3.1 Histopatologia

A principal característica histopatológica da EH é a perda de células neuronais do hipocampo associada à astrogliose desenvolvendo uma atrofia tecidual severa nas regiões específicas do hipocampo - vide Figura 1 (Sofroniew e Vinters, 2010).

Figura 1 - **A** - Um único astrócito reativo foi imunomarcadas na região CA1 de uma amostra negativa para esclerose de hipocampo. **B** - Padrão de astrogliose reativa moderada pode ser frequentemente observado no cérebro humano epiléptico. Representado a partir de uma região CA1 a EH tipo 1, com apenas uma ligeira diminuição da densidade neuronal. **C** - Astrogliose fibrilar grave com uma camada densa de processos finos em uma região esclerótica CA1 de HS tipo 1 (Blümcke et al., 2013).

1.3.2 Classificação da EH

A Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) classificou a EH em três subtipos de acordo com os dados histopatológico, que se baseia nos padrões de perda neuronal e gliose. De acordo com a classificação o tipo 1 é considerado o padrão clássico e o tipo 2 e 3 são atípicos (Blümcke et al., 2013), como demonstrado na Figura 2 abaixo:

Figura 2 - **A** - EH tipo 1 mostra perda de células piramidais preferencialmente pronunciada nos setores CA4 e CA1. Danos nos setores CA3 e CA2 são mais variáveis, mas frequentemente visíveis. Observe a perda celular variável também no giro dentado, com abundante perda de células granulares com preservação de células no subículo. **B** - EH tipo 2 (perda de células neuronais predominantes de CA1 e gliose): Este é um padrão de HS mais raro e atípico caracterizado por perda neuronal principalmente envolvendo CA1 em comparação com outros subcampos onde o dano geralmente não é realmente detectável por inspeção visual. **C** - EH tipo 3 (perda de células neuronais predominantes de CA4 e gliose): esta é caracterizada por perda restrita de células principalmente na CA4. **D** Hipocampo normal para comparação, por ILAE (Blümcke et al., 2013).

1.4 Diagnóstico da ELT-EH

O diagnóstico da ELT-EH não pode ser feito através de um critério único, requer um conjunto de sinais e sintomas associados aos dados neurofisiológicos e aos de neuroimagem que devem ser compatíveis com EH.

1.4.1 Sinais e sintomas

Os sinais e sintomas sugestivos das crises epiléticas focais do lobo temporal e a sequência na qual estes aparecem e se desenvolvem é importante para caracterizar a presença da ELT-EH.

As crises da ELT-EH se caracterizam classicamente por crises focais sem perda do contato (perceptivas) com sintomas autonômicos (ex. rubor, midríase, etc), cognitivas (ex. *déjà vu*, *jamais vu*), emocionais (ex. sensação de medo), previamente denominada de auras ou crises parciais simples (Fisher et al., 2017). Por vezes, estas ocorrem como um evento isolado, mas podem evoluir para crises com perda de contato – crises focais disperceptivas – que geralmente são acompanhadas por automatismos oroalimentares e manuais bilaterais ou ipsilaterais à lesão e distonia ou paresia do membro superior contralateral à lesão. Estas crises duram por volta de 1 minuto e apresentam um período confusional mais prolongado (1 a 3 minutos). A recuperação da linguagem (compreensão / expressão) é mais comprometida quando a lesão é do hemisfério dominante para a linguagem (Schulz et al., 2001). A crise focal perceptiva é muitas vezes relatada como uma sensação epigástrica acompanhada por náusea; arritmia, palpitação e rubor; as cognitivas estão correlacionadas com a amígdala e são relatadas como sensação de medo e ansiedade, premonição, estado de sonho e *deja vu*. Por sua vez, as crises

disperceptivas são quantificada pela redução da responsividade e reação ao meio, geralmente sendo marcada por uma parada motora (parada comportamental) e uma perda total ou parcial do contato com o meio (Fisher et al. 2017).

Os eventos motores e automatismos são característicos da ELT-EH. A distonia contralateral e o aumento do tônus mostram a associação dos núcleos da base. Por outro lado, o desvio cefálico e versão ocular precoce geralmente são ipsilaterais à lesão mesial (Revisão em Loddenkemper e Kotagal, 2005).

Os automatismos são geralmente oroalimentares (movimento mastigatório e deglutição) ou gestuais (ações motoras repetitivas). Na ELT-EH os eventos motores como correr e pedalar não são frequentes e podem estar relacionados ao espraçamento para o lobo frontal, mas não são característicos deste tipo de epilepsia (Revisão em Loddenkemper e Kotagal, 2005).

Há poucas características clínicas que diferenciam a ELT-EH da ELT determinada por outras etiologias, tais como as crises focais olfativas que são raras na ELT-EH. Por outro lado, os automatismos de membros e oroalimentares e a distonia são mais frequentes na ELT-EH (Saygi et al. 1994).

No período pós-ictal, cefaleia e confusão são normalmente relatados e são inespecíficos. A presença de disfasia/afasia é um importante sinal de lateralização para hemisfério cerebral dominante para a linguagem e a hemiparesia comumente é contralateral ao foco. A evolução para crises motoras tônico-clônicas é menos comum na ELT-EH, mas pode ocorrer (Privitera et al., 1991).

1.4.2 Aspectos eletroencefalográficos

O eletroencefalograma (EEG) de rotina geralmente demonstra atividade epileptiforme interictal caracterizada por ondas agudas seguidas de ondas lentas com eletronegatividade máxima nas regiões temporais anteriores, por vezes na região temporal médio ipsilateral ao foco (Figura 3). Nota-se, ainda, alentecimento da atividade de base ou da atividade elétrica cerebral caracterizada pela presença de ondas teta ou delta na região temporal ipsilateral, por vezes com difusão para região parassagital ipsilateral. As alterações do EEG ictal são marcadas pela atividade rítmica temporal de alfa ou teta, como demonstrado na figura 4 (Engel et. al 2007).

Figura 3 - Eletroencefalograma com atividade epileptiforme focal na região temporal esquerda compatível com ELT-EH.

Figura 4 - Eletroencefalograma com atividade epileptiforme contínua na região temporal esquerda compatível com ELT-EH.

1.4.3 Aspectos de Neuroimagem

A Ressonância Magnética (RM) é altamente sensível e específica no diagnóstico da EH. As anormalidades são frequentemente unilaterais e assimétricas, e os achados mais comuns são: atrofia do hipocampo e aumento do hipersinal nas sequências pesadas em T2, como demonstrado na Figura 5. Lesões outras como displasias, malformações vasculares e neoplasias, podem ocorrer frequentemente nos pacientes ELT-EH caracterizando os casos de *dual pathology* ou patologia dupla (Duncan, 1997).

A RM é considerada o exame “padrão ouro” para o diagnóstico *in vivo* de EH. O SPECT (*single-photon emission computed tomography*) ictal pode também ser usado para mapear as áreas de início e propagação do foco epileptogênico. A hiperperfusão ictal é utilizada para localizar a zona epileptogênica de forma não invasiva e é particularmente útil na epilepsia focal. O PET apresenta um padrão sugestivo caracterizado pelo hipometabolismo do lobo temporal acometido pela esclerose do hipocampo (Jackson et al. 1994).

Figura 5 - Ressonância Magnética com hipersinal de hipocampo ipsilateral compatível com EH.

1.5 Tratamento

O tratamento da ELT-EH em muitos casos requer intervenção cirúrgica, sendo que 80% dos pacientes com ELT-EH apresentam remissão das crises epiléticas após a cirurgia, e 60% permanecem livres de crises epiléticas no seguimento a longo prazo (Janszky et al. 2005).

1.6 O sistema dopaminérgico

A maior parte dos neurônios dopaminérgicos tem origem no mesencéfalo ventral e se projeta para outras regiões cerebrais (Nemoda et al. 2011). Existem cinco vias dopaminérgicas, onde as principais projeções são organizadas em três vias: nigroestriatal, mesolímbica e mesocortical.

A biossíntese da dopamina (DA) envolve dois passos: 1) o aminoácido tirosina é convertido através da enzima tirosina hidroxilase em di-hidroxifenilalanina, que por sua vez é transformada em DA pela enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos. No terminal axonal, a DA é rapidamente recolhida pelo transportador vesicular de monoaminas às vesículas de armazenamento. Após o deflagrar do potencial de ação, a DA é liberada das vesículas de armazenamento para a fenda sináptica (Nemoda et al., 2011).

A liberação da DA é controlada pelos receptores pré-sinápticos D2 (receptor de dopamina D2) ou D3 (receptor de dopamina D3). As moléculas de neurotransmissores agem nos receptores de DA pós-sinápticos, que pertencem a duas famílias principais (D1-like e D2-like). Nos núcleos da base, a neurotransmissão é concluída pelo transportador de DA (DAT), que bombeia de volta a DA para o neurônio pré-sináptico. A maior parte da DA recapturada é

reciclada dentro de vesículas de armazenamento para reutilização, enquanto que parte da DA livre é catabolizada pela enzima monoamino oxidase (MAO) e, subsequentemente, pela enzima aldeído desidrogenase (AD) em ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC). Posteriormente, o DOPAC é metabolizado em ácido homovanílico (HVA) pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) (Nemoda et al., 2011).

No córtex pré-frontal (CPF), o volume de transmissão é maior pela ausência do DAT. A DA pode ser transportada para neurônios noradrenérgicos pelo transportador de norepinefrina ou para células gliais através de sistemas de transporte dependentes ou não de NaCl (cloreto de sódio). A COMT realiza o primeiro passo do catabolismo, formando a 3-metoxitiramina, a qual é convertida no metabólito final da DA, o HVA, pela MAO e a AD (Nemoda et al., 2011).

1.7 Relevância da dopamina na epileptogênese

Os mecanismos fisiopatológicos da epilepsia incluem anormalidades nos sistemas de neurotransmissão monoaminérgicos, incluindo a serotonina (5HT) e a DA (Revisão em Starr, 1993; Revisão em Starr, 1996; Bagdy et al. 2007; Revisão em Bozzi et al. 2011). Embora o papel da 5HT esteja melhor estudado, a importância da DA na epilepsia é menos conhecido e controverso (Revisão em Starr, 1996,). Alguns estudos farmacológicos que utilizam modelos animais sugerem que a DA tenha efeito anticonvulsivante na epilepsia límbica (Revisão em Starr, 1996). No entanto, outros estudos demonstram evidências bioquímicas de que a disfunção dopaminérgica no cérebro das pessoas com

epilepsia e em modelos animais de crises epiléticas e epilepsia possa ser pró-convulsiva (Revisão em Starr, 1996).

Postula-se que o envolvimento da DA na epilepsia esteja relacionado a um controle disfuncional dos níveis da DA ou a uma alteração na expressão dos seus receptores. Os estudos realizados nos pacientes com epilepsia reforçam o papel da neurotransmissão modulada pela DA na epilepsia, provavelmente nos núcleos da base e no sistema límbico, sendo que a transmissão dopaminérgica nos núcleos da base poderia ter uma função inibitória (Rektor et al., 2012). Os núcleos da base não são capazes de gerar atividade epileptiforme que possa ser detectada através do EEG. No entanto, as crises epiléticas originárias da região temporal mesial podem se espalhar para os núcleos da base, que por sua vez podem atuar como um filtro para a propagação da atividade ictal (Rektor et al., 2012).

Outras evidências indiretas advêm de determinadas medicações dopaminérgicas que têm um efeito sobre o limiar epileptogênico. Neste cenário, os antipsicóticos (ou seja, antagonistas dopaminérgicos e de D2) levam à diminuição dos limiares para crises epiléticas nos pacientes com epilepsia e, mesmo, diminuem o limiar epileptogênico nos pacientes sem história prévia de crises epiléticas. Por outro lado, a inibição das crises epiléticas pode ocorrer nos pacientes que fazem uso de fármacos antiparkinsonianos, como a pergolida e a bromocriptina, sendo que ambos agem estimulando o receptor D2 (Revisão em Starr, 1996)

Além disso, diversos estudos de neuroimagem têm demonstrado redução da atividade da DA em várias formas de epilepsia. A diminuição de [18F]-fluoro-L-DOPA, indicando uma ligação reduzida para o DAT, foi

detectada nos núcleos da base dos pacientes com epilepsia farmacorresistente (Biraben et al., 2004; Del Sole et al., 2010), epilepsia ausência e ELT-EH (Bouilleret et al., 2005). Nos pacientes com ELT-EH, observou-se a redução do [18F] fluoro-L-DOPA no núcleo caudado, putamen e substância negra (Bouilleret et al., 2008). A redução do potencial de ligação do DAT também tem sido observada nas formas geneticamente determinadas de epilepsia, tais como nos pacientes com epilepsia mioclônica juvenil (Ciumas et al., 2008; Odano et al., 2012) e epilepsia com crises tônico-clônicas primariamente generalizadas (Ciumas et al., 2010).

1.8 Relevância dos receptores dopaminérgicos na epileptogênese

As alterações dos receptores D1 e D2 têm sido associadas a diferentes formas de epilepsia, através dos estudos de neuroimagem funcional nos humanos.

A redução da densidade dos receptores D2/D3 (como avaliado por PET usando marcadores de alta afinidade para DA D2/D3) foi documentada no lobo temporal de pacientes com ELT-EH. Curiosamente, a redução da ligação [18F] não se correlacionou com a atrofia do hipocampo, indicando que esta redução da densidade D2/D3 não é apenas uma consequência do processo degenerativo, mas pode desempenhar um papel específico na fisiopatologia da ELT-EH (Werhahn et al., 2006). Os mesmos autores também demonstraram uma redução na densidade D2/D3 no putamen dos pacientes com epilepsia mioclônica juvenil (Landvogt et al., 2010).

Rocha et al. (2012) avaliaram a expressão e ligação do D1 e D2 nas amostras de córtex cerebral de pacientes com ELT-EH tratados cirurgicamente.

Em comparação com amostras de voluntários saudáveis, o aumento da expressão e ligações de D1 e diminuição da expressão de D2 foram detectados no neocórtex destes pacientes, enquanto a ligação do D2 não foi afetada. As amostras de ELT-EH também apresentaram aumento na capacidade de ligação do DAT e baixa concentração de DA no tecido (Rocha et al., 2012). É interessante notar que, neste estudo, a ligação dos receptores D1 esteve negativamente relacionada com a idade de início da epilepsia e a frequência das crises epiléticas, e positivamente com a duração da epilepsia. Por outro lado, a ligação D2 esteve positivamente correlacionada com a idade de início da epilepsia e negativamente associada com a duração da epilepsia (Rocha et al., 2012). Desta forma, sugere-se que haja um papel pró-epileptogênico do receptor D1 e antiepileptogênico do D2, e que a alteração da função ou o desequilíbrio do sistema dopaminérgico pode contribuir para a ELT.

Nos modelos animais, os níveis de DA e os seus metabólitos variam significativamente, dependendo do tipo de modelo considerado para o estudo da epilepsia (Meurs et al., 2008). No entanto, é interessante notar que o aumento dos níveis de DA (Meurs et al., 2008), bem como o aumento neuronal de DA (Cifelli e Grace 2012), são detectados nos modelos de roedores com ELT. Estes resultados sugerem também que as variações dos níveis de DA muito provavelmente alterem a ação neuromoduladora da DA nos circuitos cerebrais do sistema límbico.

Neste cenário, a interação glutamato/DA foi proposta para explicar a susceptibilidade individual à epilepsia nas áreas límbicas (Revisão em Starr, 1996). De acordo com esta hipótese, a atividade paroxística do córtex cerebral

no cérebro do paciente com epilepsia aumenta a excitação tônica dos neurônios dopaminérgicos pela ação do glutamato. Este, então, induziria à liberação fásica da DA (liberação em grande quantidade de DA na fenda sináptica), possivelmente, levando a *downregulation* ou dessensibilização dos receptores dopaminérgicos e, posteriormente, diminuindo estas respostas fásicas. Portanto, a DA exerceria um efeito inibitório na excitabilidade hipocampal através da ativação de receptores D2.

No estudo de Bozzi e Borelli (2013), os autores sugerem que a sinalização do receptor tipo D2 na epilepsia límbica indica que a diminuição da função do D2 pode ser um precursor da epilepsia e pode contribuir para a epileptogênese através da morte de células neuronais, concluindo que os efeitos benéficos de drogas agonistas do receptor D2 observados na epilepsia animal e humana merecem mais atenção (Revisão em Bozzi e Borelli, 2013).

O receptor D4 pertence à família do receptor do tipo D2. Este receptor tem um papel inibidor proeminente na hiperexcitabilidade neuronal. Rubinstein et al. (2001) observou, nos roedores tratados com um antagonista do receptor D4, o aumento da frequência da atividade sináptica espontânea e da duração das descargas epiléticas induzidas por bicuculina (Rubinstein et al., 2001).

1.9 Polimorfismos relacionados ao sistema dopaminérgico

Uma herança poligênica e multifatorial tem sido proposta para a maioria das doenças neuropsiquiátricas, mesmo para aquelas que apresentam uma herdabilidade estimada em 90% (Lauder, 1993). Os dois tipos de polimorfismos mais estudados em análise de genes candidatos são os caracterizados por número variável de repetições em tandem (*VNTR* - do inglês *variable number*

of tandem repeats) e os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP - do inglês *single nucleotide polymorphism*). Com base nas teorias neurobiológicas, os polimorfismos relacionados à transmissão monoaminérgica são os mais estudados nos transtornos psiquiátricos (Lauder, 1993), mas não nas doenças neurológicas, como a epilepsia.

1.9.1 Genes relacionados aos receptores de dopamina

1.9.1.1 Polimorfismo do gene do receptor dopaminérgico

DRD2 Polimorfismo TaqI A do DRD2 - rs 1800497

O gene que codifica o receptor D2 foi mapeado por Grandy et al. (Grandy et al. 1989) e está localizado no cromossomo 11 (Cr 11q22-23). Sua sequência codificadora apresenta 7 domínios transmembrânicos e 6 Introns (Noble, 2000). O polimorfismo mais estudado do *DRD2* é o polimorfismo TaqI, que está localizado a 10Kb da posição 3' do gene (*reference single nucleotide polymorphism* – referência *SNP* - 1800497).

As variações genéticas das vias dopaminérgicas têm sido associadas à maior ocorrência de efeitos adversos do tratamento com fármacos antiepilépticos, principalmente nos pacientes que têm variantes genéticas associadas com a diminuição da atividade dopaminérgica (DA- β -*hydroxylase*, DBH; *catecol-O-metiltransferase*, COMT e D2). Alguns autores demonstraram uma maior susceptibilidade aos efeitos psiquiátricos adversos decorrentes do uso de levetiracetam (LEV) (Wood, 2012; Helmstaedter et al., 2013). O trabalho de Helmstaedter et al. (2013), avaliando 290 pacientes com epilepsia em uso de LEV, demonstrou uma frequência maior de efeitos adversos psiquiátricos nos pacientes que apresentavam diminuição da atividade dopaminérgica

relacionada aos polimorfismos do tipo SNP rs1611115 (DBH), rs4680 (COMT), e rs1800497 (receptor D2 TAQ-1A) (Helmstaedter et al. 2013). Em uma segunda análise com 100 pacientes com epilepsia, confirmou-se o efeito do polimorfismo rs1800497 (Helmstaedter et al., 2013).

Estes resultados sugere que a redução da transmissão dopaminérgica nos pacientes com epilepsia pode contribuir para a piora da tolerabilidade a determinados fármacos antiepilépticos.

1.9.1.2 Polimorfismo do gene do receptor dopaminérgico DRD4 Polimorfismo DRD4 - VNTR

O gene codificador do D4 foi mapeado na região 11p15.5, e consiste de 4 éxons. O subtipo D4 é um receptor acoplado à proteína G que inibe a adenil ciclase (AC). A AC é uma enzima amplificadora, que transforma adenosina trifosfato em adenosina monofosfato cíclica sendo uma molécula importante na transdução do sinal celular (Van Tol et al., 1991).

O polimorfismo dopaminérgico do gene DRD4 VNTR contém 48 pares de bases, no éxon 3 com variações entre 2 e 10 repetições. Este receptor pertence à família do receptor tipo D2 e está localizado em várias regiões cerebrais, incluindo estruturas cerebrais límbicas (Van Tol et al., 1991; Asghari et al., 1995).

1.9.1.3 Polimorfismo do gene do receptor dopaminérgico DRD4 Polimorfismo DRD4 - SNP rs1800955

Outro sítio frequentemente estudado do D4 é o polimorfismo do tipo SNP rs1800955, localizado a 521 pares de bases (Lichter et al., 1993).

Considerando os polimorfismos do receptor D4 *VNTR* e rs1800955 *SNP*, estudos em animais demonstraram uma maior predisposição às crises epiléticas sendo mais susceptíveis ao efeito convulsivante da bicuculina - antagonista dos receptores GABAA (Rubinstein et al., 2001). Não há estudos em humanos que evidenciem que estas alterações levem a uma diminuição do limiar epileptogênico.

1.10 Genes relacionados ao transportador dopaminérgico - DAT

1.10.1 Gene DAT

O DAT é uma proteína transmembrana com 620 aminoácidos. O DAT media a recaptação da DA na fenda sináptica após a sua liberação, desempenhando um papel fundamental na regulação da neurotransmissão dopaminérgica. O gene que codifica a proteína do DAT foi mapeado na região 5p15.3 e consiste em 15 éxons intercalados por 14 íntrons, e possui um único sítio para o início da sua transcrição (Vandenberg et al., 1992).

1.10.2 Polimorfismo da região 3' não-traduzida (UTR) do gene DAT - 3'UTR

O polimorfismo mais intensamente pesquisado é um *VNTR* no éxon 15, com 40 pares de bases na região 3' não-traduzida (*UTR*) com variações entre 3 e 13 repetições. O alelo mais frequente é o de 10 repetições, seguido pelo de 9 repetições e os demais são variantes raras. Os resultados de estudos comparativos com relação à função biológica entre as variantes mais frequentes são controversos (Sander et al., 2000). O estudo de Sander et al. (Sander et al., 2000) com 133 indivíduos com epilepsias generalizadas

geneticamente determinadas (EGGD) demonstrou um aumento na frequência do alelo de 9 repetições ($p=0,043$) nos pacientes com epilepsia mioclônica juvenil e epilepsia ausência da infância quando comparados aos voluntários saudáveis.

Devido à sua relevância biológica e estrutural indeterminada, sugere-se que este *VNTR* pode influenciar na regulação da transcrição e tradução da expressão gênica (Mill et al., 2002). Como seu mecanismo de ação é obscuro, outras regiões do gene que pudessem estar em equilíbrio de ligação com a região 3 não traduzida do DAT têm sido avaliadas, com intuito de identificar polimorfismos ou outras regiões funcionais do gene. Desta forma, foram identificados haplótipos que impactam significativamente na expressão do gene DAT.

1.10.3 Polimorfismo da região Intron 8 do gene DAT - Intron 8

O Intron 8 do gene DAT é um *VNTR* de 30 pares de bases que possui alelos com 5 e 6 repetições com maior frequência. Embora o alelo com 3 repetições possua uma expressão basal reduzida quando comparado ao de 2 repetições, este pode ser mais facilmente induzido e apresentar níveis transcricionais mais altos do que o alelo de 2 repetições (Brookes et al., 2007).

1.11 Genes relacionados aos metabolizadores dopaminérgicos

1.11.1 Polimorfismo relacionado à monoamino oxidase A - MAOA

Há um *VNTR* de 30 pares de bases na região 5' UTR do gene da MAOA, localizado 1,23 kb acima do éxon 1 (MAOA-u*VNTR*), que tem sido

amplamente estudado e afeta tanto a atividade enzimática quanto a expressão gênica. Os alelos mais comuns contêm 3 ou 4 repetições, e os menos frequentes contêm 2, 3.5 e 5 repetições. O alelo de 3 repetições possui uma atividade transcricional menor quando comparado ao de 3.5 e 4 repetições em experimentos *in vitro* (Sabol e Hamer, 1998; Deckert et al. 1999;), em cultura de fibroblastos (Denney et al., 1999) e em amostras de tecido cerebral post-mortem (Balciuniene et al., 2002).

1.11.2 Polimorfismo relacionado à Catecol O-Metiltransferase - COMT

Há um SNP específico nos humanos - G/A localizado no códon 158º (rs4680) na forma da COMT ligada à membrana - que causa uma substituição de valina por metionina (Val¹⁵⁸Met), enquanto que na COMT, forma solúvel, o mesmo polimorfismo está localizado no códon 108º. A variante metionina (Met - alelo) apresenta menor estabilidade a 37°C resultando em uma redução de 20 a 25% na atividade enzimática quando comparada à variante valina, codificada pelo alelo G (Chen et al., 2004). Estas variações causam diferenças na concentração da DA cortical e afetam processos relacionados à cognição.

O genótipo Met/Met tem sido implicado à maior concentração de dopamina (Golimbet et al., 2007). Por outro lado, o genótipo Val/Val está associado a menor concentração de dopamina (Reuter e Hennig 2005).

1.12 BDNF - Brain-Derived Neurotrophic Factor

O BDNF (do inglês *brain-derived neurothophic factor*) é uma proteína neurotrófica relevante no sistema nervoso central (SNC), que tem um papel

importante na sobrevivência, diferenciação e desenvolvimento neuronal (Huang e Reichardt, 2001). As principais neurotrofinas (NTs) identificadas em mamíferos são: o NGF (do inglês *nerve growth factor*), o BDNF, e as neurotrofinas NT-3 e NT-4 (Thoenen, 1991). O sistema das neurotrofinas é capaz de regular os processos celulares vitais como a liberação de neurotransmissores, diferenciação e sobrevivência neuronal.

1.12.1 BDNF relacionado a epileptogênese

A compreensão dos mecanismos que regulam a expressão de NTs nos outros processos degenerativos nas epilepsias é fundamental e importante, e pode levar a abordagens terapêuticas efetivas (Kandratavicius et al., 2010).

As NTs parecem ter um papel chave na plasticidade sináptica relacionada à epilepsia, onde podem agir tanto como fatores promotores da epileptogênese quanto como substâncias antiepileptogênicas endógenas (Gall, 1993). A recorrência de crises epiléticas pode causar alterações na expressão dos fatores de crescimento que perduram da fase aguda à fase crônica da epileptogênese e, também, alteram a expressão dos receptores (Garcia et al., 1997). O hipocampo é uma estrutura importante no sistema límbico e a EH é caracterizado por atrofia, perda neuronal e proliferação astrogliar. Esta caracterização é frequentemente encontrada nos pacientes com ELT-EH. A proliferação de astrócitos pode contribuir para a excitabilidade elétrica do hipocampo gerando foco excitatório. A proliferação dos astrócitos pode, ainda, fornecer pistas sobre uma variedade de fatores precipitantes precoces que contribuem para o desenvolvimento de ELT (de Lanerolle e Lee, 2005)

1.12.2 Polimorfismo Val66Met do BDNF e epileptogênese

O polimorfismo do gene do BDNF mais estudado é a substituição de guanina por adenosina, no nucleotídeo 196, resultando na troca do aminoácido valina por metionina no códon 66 da proteína do pró-BDNF - o Val66Met. Não é observada modificação da estrutura final da proteína decodificada, muito menos em sua concentração intra-neuronal (Egan et al., 2003). Sugere-se que o polimorfismo estaria associado à alteração no tráfego intracelular e secreção do BDNF, com redução de cerca de 50% de BDNF produzido (Martinowich et al., 2003). A secreção de BDNF e a função do hipocampo podem ser influenciadas pelo polimorfismo Val66Met (Egan et al., 2003; Bovolenta et al., 2010). A alta expressão do BDNF no hipocampo pode levar a efeitos a longo prazo, incluindo a hiperexcitabilidade da rede do hipocampal através da atividade ictal (Binder et al., 2001).

Segundo alguns autores, o aumento da expressão de BDNF reduz o processo neuroinflamatório na epilepsia precoce e tem um efeito protetor na progressão da doença (Egan et al., 2003).

O papel do polimorfismo Val66Met na epilepsia, no entanto, ainda é controverso. Uma associação entre Val66Met e ELT foi relatada pela primeira vez por Kanemoto et al. (2003). Esses autores observaram que o BDNF pode ser um marcador genético que indica aumento da suscetibilidade à epilepsia focal (Kanemoto et al., 2003).

2. JUSTIFICATIVA

A via dopaminérgica é uma via mesolímbica com grande envolvimento das estruturas do sistema límbico e suas conexões com núcleos da base e córtex pré-frontal (Revisão em Starr, 1996). Evidências obtidas de estudos de modelos animais e de neuroimagem em humanos demonstram o comprometimento da via dopaminérgica na ELT-EH (Revisão em Bozzi e Borelli; 2013), que representa o tipo de epilepsia farmacorresistente mais comum no adulto (Berg et al., 2010). Surpreendentemente, os estudos genéticos sobre a relevância desta via na epileptogênese decorrente da esclerose de hipocampo são escassos.

Neste trabalho propôs-se um estudo controlado com voluntários saudáveis, abordando a relação dos polimorfismos dopaminérgicos em uma amostra homogênea quanto à etiologia, ou seja, somente pacientes com ELT-EH.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este foi um estudo de associação, caso-controle, com o objetivo de determinar a presença de polimorfismos relacionados à via dopaminérgica em uma amostra etiologicamente homogênea de pacientes com ELT-EH em comparação a um grupo de voluntários saudáveis.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a possível associação entre os polimorfismos do gene que codifica o transportador de dopamina e seus haplótipos (DAT 3'UTR VNTR e Intron 8 VNTR) e a ELT-EH em comparação a um grupo de voluntários saudáveis.
2. Determinar a possível associação entre o polimorfismo do gene que codifica a MAOA - MAOA-uVNTR - e a ELT-EH em comparação a um grupo de voluntários saudáveis.
3. Determinar a possível associação entre os polimorfismos dos genes que codificam os receptores de dopamina D2 rs1800497, D4 rs1800955 e DRD4 VNTR e a ELT-EH em comparação a um grupo de voluntários saudáveis.
4. Determinar a possível associação entre o polimorfismo do gene que codifica a COMT - rs4680 (Val¹⁵⁸Met) - e a ELT-EH em comparação a um grupo de voluntários saudáveis.

5. Determinar a possível associação entre o polimorfismo do gene que codifica o BDNF - rs6265 (Val66Met) - e a ELT-EH em comparação a um grupo de voluntários saudáveis.

4. MÉTODOS

4.1 Participantes

Os pacientes com ELT-EH e voluntários saudáveis que participaram desse estudo assinaram um termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP (45168915.1.0000.0068).

4.1.1 Critérios de inclusão

Todos os pacientes foram submetidos a uma avaliação clínica e entrevistados com um questionário padrão. Foram incluídos pacientes com o diagnóstico de ELT-EH, classificados de acordo com os critérios da *International League Against Epilepsy* (Blümcke et al., 2013). Para a inclusão neste estudo, todos os pacientes tiveram diagnóstico por neuroimagem realizado com RM de encéfalo compatível com EH e dados clínicos e neurofisiológicos que corroboraram a presença de crises epiléticas com origem no lobo temporal.

Para a inclusão neste estudo, todos os voluntários saudáveis foram recrutados da população geral, de ambos os sexos e sem parentesco com os sujeitos da pesquisa. Inicialmente, os voluntários foram submetidos a uma entrevista neurológica seguida por um exame físico e neurológico a fim de excluir transtornos neurológicos não diagnosticados ou informados pelos participantes. Como instrumento de seleção preliminar para a investigação de transtornos psiquiátricos da amostra de voluntários saudáveis foi utilizado o PRIME-MD e, posteriormente, os voluntários foram avaliados com o SCID I

(*Structured Clinical Interview Disorders*) de acordo com o DSM-IV (*American Psychiatric Association*, 2000).

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos: 1. Pacientes com outros tipos de epilepsia; 2. Pacientes com *dual pathology* detectável à RM de encéfalo; 3. Pacientes com ausência de lesão à RM de encéfalo; 4. Voluntários que tenham preenchido critérios diagnósticos para transtornos psiquiátricos e/ou presença de distúrbio neurológico e; 5. Recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.1.3 Caracterização dos pacientes com ELT-EH

Dos 181 pacientes com epilepsia encaminhados com suspeita de ELT-EH, 62 pacientes com hipótese diagnóstica para ELT foram excluídos por não preencherem os critérios diagnósticos. As causas para exclusão foram: ELT sem lesão detectável à RM, presença de tumores, malformação do desenvolvimento cortical e outras formas de epilepsias.

Os pacientes recrutados são provenientes do Grupo Estudo de Epilepsia - Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Instituto Neurológico de Goiânia.

Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e foram entrevistados com um questionário padrão. Para este estudo, incluímos pacientes diagnosticados com ELT-EH, classificados de acordo com os critérios da *International League Against Epilepsy* (Blümcke et al., 2013). Portanto, todos os pacientes tiveram um diagnóstico de neuroimagem baseado em RM

compatível com HS e todos apresentados com dados clínicos e neurofisiológicos que corroboraram a ELT.

Com base nesses critérios, foram incluídos 119 pacientes com ELT-EH. Cinquenta e um pacientes (42,8%) eram do sexo masculino, com idade média de 38,6 anos (DP = 13,8 anos, Min / Máx: 9-70 anos). A etnia de cada participante foi inferida de dados auto-relatados utilizando a classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2008) - branco, negro, pardo, indiano e amarelo. De acordo com este critério, a distribuição étnica foi de: 87 (73,1%) brancos, 17 (14,3%) pardos e 15 (12,6%) negros.(Tabela 1)

A média de idade de ocorrência da primeira crise epiléptica foi de 10 anos (DP = 9.4; Min/Max: 06 meses - 48 anos), com média de duração da epilepsia de 25 anos (DP = 13.1; Min/Max: 03 - 59 anos). Quarenta e seis pacientes (38,5%) tinham ELT-EH à direita, 59 à esquerda (49,6%), e 14 bilateral (11,9%). Vinte e quatro pacientes (20,5%) estavam em monoterapia e 95, em politerapia (79,5%). A presença de crise focal disperceptiva foi observada em todos os pacientes e a presença de CTCG foi observada em 73 pacientes (62,4%). A ocorrência de estado de mal epiléptico foi documentada em 19 pacientes (16,2%) e crises febris ocorreram em 26 pacientes (22,2%). (Tabela 2)

Tabela 1. Variáveis demográficas.

Caracterização dos grupos	ELT-EH		Controles saudáveis		P
	N	%	n	%	
Sexo					
Feminino	68	57,2	56	50	0,306 ¹
Masculino	51	42,8	56	50	
Etnia					
Branco	87	73,2	68	60,2	0,056 ²
Negro	17	14,2	24	21,2	
Pardo	15	12,6	17	15,1	
Amarelo	-	-	4	03,5	
	Média	DP	Média	DP	
Idade Média	38,49	13,73	32,57	11,11	0.001 ³

¹ Teste do Chi-quadrado; ² Teste exato Fisher's; ³ Brunner-Munzel test.

Tabela 2. Variáveis clínicas da ELT-EH.

ELT-EH		%
Idade média da primeira crise em anos	10	–
Média de duração da epilepsia em anos	25	–
Lateralidade da lesão		
Direita	46	38,5
Esquerda	59	49,6
Bilateral	14	11,9
Uso de FAE		
Monoterapia	24	20,5
Politerapia	95	79,5
Presença de crise focal disceptivas	119	100
Presença de CTCG	73	62,4
Presença de estado de mal epilético	19	16,2
Presença de crise febril	26	22,2

4.1.4 Voluntários saudáveis

Dos 128 voluntários avaliados na triagem, 16 foram excluídos por preencherem critérios para transtorno psiquiátrico ou neurológico tais como: transtorno depressivo, transtorno de ansiedade e histórico prévia de epilepsia.

Com base nesses critérios, foram incluídos 113 voluntários saudáveis. Cinquenta e sete indivíduos (50,4%) eram do sexo feminino com idade média de 32,7 anos (DP = 11,0; Min / Máx: 17 - 64 anos). A distribuição étnica foi de 68 (60,2%) brancos, 24 (19,5%), 17 (15,0%) negros e 4 (5,3%) amarelos. (Tabela 1)

4.1.5 Instrumentos clínicos

1. PRIME-MD (*Primary Care Evaluation of Mental Disorders*): auto-questionário que consiste em 26 perguntas sobre os sinais e sintomas do último mês, relacionados a transtorno psiquiátrico (*American Psychiatric Association*, 2000).
2. SCID I (*Structured Clinical Interview Disorders*): entrevista semiestruturada para os principais diagnósticos do Eixo I do DSM-IV, de acordo com o DSM-IV (*American Psychiatric Association*, 2000).

4.2 Genotipagem

O DNA foi extraído de leucócitos obtidos da coleta de sangue periférico, com anticoagulante EDTA (*Ethylenediaminetetra-Acetic Acid*), através do método de extração salino (*salting-out*) (Laitinen et al., 1994). A qualidade e quantidade das amostras de DNA foram avaliadas em espectrofotômetro

Nanodrop 1000 (ThermoScientific) e diluído em tampão TE (10 mM Tris-HCl - pH 8,0, 1 mM EDTA). A concentração final do DNA foi de 25 ng/μl diluído em água ultrapura. Em todo o processo de padronização e normalização das análises dos polimorfismos, foi adotado a amplificação em duplicata da amostra, controle branco (solução sem DNA) e controles para homozigotos e heterozigotos por placa. Para os SNPs, foi utilizado o método de discriminação alélica utilizando o sistema *TaqMan®*. Esse método utiliza um sistema de fluorescência, que é capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação do DNA polimerase por sondas marcadas com corantes fluorescentes através do aparelho de PCR em tempo real (BIOER Technology CO). Para os polimorfismos do tipo *VNTR* foi utilizada a reação em cadeia polimerase (PCR) convencional. Foram desenvolvidos protocolos de padronização para amplificação das regiões de interesse para cada gene de escolha, e em seguida para todos os polimorfismos *VNTR* foi realizada a análise no analisador de fragmentos (*Fragment Analyzer®*), através do método de eletroforese capilar, utilizando o kit de análise de 35-1500 pares de bases e posteriormente analisado no software PROSize 2.0 1.3.1.1 Copyright Advanced Analytical Technologies, Inc.

4.2.1 Métodos de amplificação para polimorfismos do tipo SNP

4.2.1.1 Polimorfismo do receptor *DRD2* (*DRD2 TAQL A rs1800497*)

Para o polimorfismo do receptor D2 (*DRD2 TAQL A rs1800497*) foi realizada a reação de amplificação que é composta por: GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega®) 1μl (1x), ensaio de genotipagem para SNP *TaqMan®*

(Life Technologies®) 1µl (1x) e DNA genômico 10ng/µl. Foi adicionada água ultrapura para completar volume de 7µl.

A sequência polimórfica do DRD2 utilizada para a confecção do ensaio de genotipagem para o SNP TaqMan® foi:

TGGACGTCCAGCTGGGCGCCTGCCT[C/T]GACCAGCACTTTGAGGATGGC
TGTG

As amplificações dos alelos estão discriminadas nas Figuras 6-8.

Figura 6 - Representação da amplificação do polimorfismo do D2 (DRD2 TAQL A_rs1800497). Alelo - T.

Figura 7 - Representação da amplificação do polimorfismo do D2 (DRD2 TAQL_rs1800497). Alelo - C.

Figura 8 - Representação da amplificação do polimorfismo do D2 (DRD2 TAQL A_rs1800497). Alelo CT.

4.2.1.2 Polimorfismo do receptor DRD4 (DRD4 rs1800955)

Para o polimorfismo do receptor D4 (DRD4_rs1800955) foi realizada a reação de amplificação composta por: GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega®) 1µl (1x), ensaio de genotipagem para SNP TaqMan® (Life Technologies®) 1µl (1x), betaína 0,5M/µl (Sigma®), DNA genômico e 10ng/µl de água ultrapura para completar volume um volume total de 7µL.

A sequência polimórfica do DRD4 rs1800955 utilizada para a confecção do ensaio de genotipagem TaqMan® foi:

GGGCAGGGGAGCGGGCGTGGAGGG[C/T]GCGCACGAGGTCTGAGGCGA
GTCCGC

As amplificações dos alelos estão discriminadas nas Figuras 9-11.

Figura 9 - Representação da amplificação do polimorfismo do D4 (DRD4_rs1800955). Alelo - C.

Figura 10 - Representação da amplificação do polimorfismo do D4 (DRD4_rs1800955). Alelo - T.

Figura 11 - Representação da amplificação do polimorfismo do D4 (DRD4_rs1800955). Alelos CT.

4.2.1.3 Polimorfismo da COMT (COMT rs 4680)

Para o polimorfismo da COMT (COMT_rs4680) foi realizada a reação de amplificação composta por: GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega®) 1μl (1x), ensaio de genotipagem para SNP TaqMan® (Life Technologies®) 1μl (1x), DNA genômico 10ng/μl e água ultrapura para completar o volume total de 7μl. A sequência polimórfica da COMT rs 4680 utilizada para a confecção do ensaio de genotipagem TaqMan® foi:

CCAGCGGATGGTGGATTTCGCTGGC[A/G]TGAAGGACAAGGTGTGCATGC
CTGA

As amplificações dos alelos estão discriminadas nas Figuras 12-14.

Figura 12 - Representação da amplificação do polimorfismo COMT (rs47680). Alelo - A.

Figura 13 - Representação da amplificação do polimorfismo COMT (rs47680). Alelo - G.

Figura 14 - Representação da amplificação do polimorfismo COMT (rs4680). Alelo AG.

4.2.1.4 Polimorfismo do BDNF (BDNF rs6265)

Para o polimorfismo do BDNF (BDNF_rs6265) foi realizada a reação de amplificação composta por: GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega®) 1µl (1x), ensaio de genotipagem para SNP TaqMan® (Life Technologies®) 1µl (1x), betaína 0,5M/µl (Sigma®), DNA genômico 10ng/µl e água ultrapura para completar o volume de 7µL.

A sequência polimórfica do BDNF rs6265 (Val66Met) utilizada para a confecção do ensaio de genotipagem TaqMan® foi:

ATCATTGGCTGACACTTTCTGAACAC[A/G]TGATAGAAGAGCTGTTGGATGA
GGA

As amplificações dos alelos estão discriminadas nas Figuras 15 -17.

Figura 15 - Representação da amplificação do polimorfismo BDNF Val66Met (rs6265). Alelo - A.

Figura 16 - Representação da amplificação do polimorfismo BDNF Val66Met (rs6265). Alelo - G.

Figura 17 - Representação da amplificação do polimorfismo BDNF Val66Met (rs6265). Alelos - AG.

4.3 Protocolo de ciclagem para discriminação alélica dos polimorfismos do tipo *SNP*.

Para a discriminação alélica foi utilizado o aparelho de PCR em tempo real modelo *Line Gene 9600* (BIOER Technology CO), foram comparadas às curvas e os níveis de fluorescência antes e depois da amplificação. Para todos os polimorfismos do tipo *SNP* foi programado a ciclagem para 45 ciclos de 15 segundos à 95°C e 1min à 60°C e resfriamento à 4°C.

4.4 Método de amplificação para polimorfismos do tipo VNTR.

Para os polimorfismos do tipo VNTR, as seguintes reações de amplificação da região de interesse por PCR convencional foram realizadas:

4.4.1 Polimorfismo do 3'UTR do gene DAT

Para o polimorfismo 3'UTR do gene DAT foi desenvolvido o seguinte protocolo para ampliação: sequência de Primer-F TGCGGTGTAGGGAACGGCCTGAG e Primer-R CTCCTGGAGGTCAAGG (Exxtend®) 100mM (1µl), buffer 1µL (10x) (Invitrogen®), dNTP 1,25nM (Invitrogen®) 1,6µl, platinum Taq polimerase 5U 0,5µl (Invitrogen®), Mgcl 50 mM 0,3µl (Invitrogen®), DNA genômico 100ng 4µl e água ultrapura para completar volume de 10µl. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial de 95° C durante 2 minutos seguidos por 40 ciclos à 95° durante 30 segundos, 56° durante 30 segundos, 72° durante 45 segundos, extensão final de 72° C durante 10 minutos e resfriada à 4° e posteriormente armazenada à -20°C. As amplificações dos alelos estão representadas nas Figuras 18 e 19.

Figura 18 - Representação do gel virtual da amplificação do polimorfismos 3'UTR VNTR.

Figura 19 - Representação da amplificação do polimorfismo 3'UTR VNTR.

4.4.2 Polimorfismo do Intron 8 do gene *DAT*

Para o polimorfismo Intron 8 do gene *DAT* foi desenvolvido o seguinte protocolo para ampliação: sequência de Primer-F - GCATGTGGATGTCTTCTTGC e Primer-R AAGGAAGGGGCAGAAACAAG 100mM 1,0μl (Exxtend®) 100mM (1μl), buffer 1μL (10x) (Invitrogen®), dNTP 1,25nM (Invitrogen®) 1,6μl, platinum Taq polimerase 5U 0,5μl (Invitrogen®), Mgcl 50 mM 0,3μl (Invitrogen®), DNA genômico 100ng 4μl e água ultrapura para completar o volume de 10μl.

As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial de 95° C durante 2 minutos seguidos por 40 ciclos à 95° durante 30 segundos, 56° durante 30 segundos, 72° durante 45 segundos, extensão final de 72° C durante 10 minutos e resfriada à 4° e posteriormente armazenada à -20°C. As amplificações do polimorfismo estão representadas nas Figuras 20 e 21.

Figura 20 - Representação do gel virtual da amplificação do polimorfismo Intron 8 VNTR.

Figura 21 - Representação da amplificação do polimorfismo Intron 8 VNTR.

4.4.3 Polimorfismo da MAOA

Para o polimorfismo da MAOA_uVNTR DAT foi desenvolvido o seguinte protocolo para ampliação: sequência de Primer-F - ACAGCCTGACCGTGGAGAAG e Primer-R GAACGGACGCTCCATTCGGA (Exxtend®) 100mM (0,05μl), buffer 1μl (10x)(Invitrogem®), dNTP 1,25mM (Invitrogem®) 1,6μl, platinum Taq polimerase 5U (0,1μl) (Invitrogem®), Mgcl 50 mM (0,3μl) (Invitrogem®), DNA genômico 25ng (2μl) e água ultrapura para completar o volume de 10μl. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial de 95° C durante 2 minutos seguidos por 45 ciclos à 94° durante 30 segundos , 60° durante 30 segundos, 72° durante 40 segundos, extensão final de 72° C durante 5 minutos e resfriada à 4° e posteriormente armazenada à -

20°C. As ampliações do polimorfismo estão representadas nas Figuras 22 e 23.

Figura 22 - Representação do gel virtual da amplificação do polimorfismo da MAOA_uVNTR.

Figura 23 - Representação da amplificação do polimorfismo MAOA_uVNTR.

Como o gene MAOA está localizado no cromossomo X, foi utilizada: 1) a classificação de Sabol et al (Sabol et al., 1998); 2) classificação de Caspi et al

(Caspi et al., 2002) para designar os alelos como baixa ou alta atividade. Os alelos 2 - 2,5 - 3 - 5 e 5,5 repetições foram classificados como baixa atividade e os alelos 3,5 - 4 repetições foram classificados com alta atividade.

4.4.4 Polimorfismo do DRD4 VNTR

Para o polimorfismo DRD4 VNTR foi desenvolvido o seguinte protocolo para ampliação: sequência do Primer-F - AGGACCCTCATGGCCTTG e Primer-R GCGACTACGTGGTCTACTCG. (Exxtend®) 100 mM (0,5µl), buffer 1,5µl (10x) e DMSO 0,5µl (1x) (Invitrogen®), 10 mM dATP, dCTP, e dTTP, 0,18µl cada, e 10 mM dGTP e 7-deaza-dGTP com 1,6µl (Invitrogen®), platinum Taq polimerase 5U (0,76µl) (Invitrogen®), Mgcl 50 mM (0,4µl) (Invitrogen®), betaína 0,5M (5µl) (Sigma®), DNA genômico 200ng (4µl) e água ultrapura para completar volume de 15µl.

As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial de 95°C durante 2 minutos seguidos por 40 ciclos a 95° durante 30 segundos, 58° durante 1 minuto, 72° durante 1 minuto e 30 segundos, extensão final de 72° C durante 10 minutos e resfriada à 4° e posteriormente armazenada à -20°C.

O polimorfismo do receptor DRD4 VNTR foi classificado de acordo com Mallard et al. 2016 (Mallard et al., 2016). Segundo estes autores: 1) genótipos homozigotos com ≥ 7 repetições são classificados como alelo longo; 2) genótipos heterozigoto com ≤ 6 repetições e ≥ 7 repetições são classificados como alelo Longo e Curto; 3) genótipos homozigotos com ≤ 6 repetições são classificados como alelo curto. As amplificações do polimorfismo estão representadas nas Figuras 24 e 25.

Figura 24 - Representação do gel virtual da amplificação do polimorfismo DRD4 VNTR.

Figura 25 - Representação da ampliação do polimorfismo DRD4 VNTR.

4.5 Análise estatística

Foram realizadas análises descritivas para obtenção dos valores de média e desvio padrão de cada uma das variáveis observadas. Para todas as análises estatísticas adotou-se um valor de $p \leq 0,05$ com um intervalo de confiança de 95%.

As variáveis categoriais foram comparadas entre os grupos pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, enquanto que as variáveis numéricas foram comparadas pelo teste Brunner-Munzel. Para estas análises foi utilizado o R Commander versão 3.3.0.

4.5.1 Análise de haplótipos

A análise de polimorfismos que estão ligados entre si, apresentando alta taxa de Desequilíbrio de Ligação (DL), merece maior atenção. Existe a possibilidade de associação dos haplótipos quando há uma sequência de alelos de um ou mais loci adjacentes na mesma região cromossômica do gene investigado. Neste contexto, a análise dos haplótipos pode ser mais informativa que a análise de um único polimorfismo (Epstein e Satten, 2003).

Para a análise da distribuição da frequência para os haplótipos do gene DAT (3'UTR e Intron 8) foi utilizado o programa estatístico R commander versão 3.3.0, biblioteca haplo.stats 1.7.7.

4.5.2 Cálculo do poder amostral

O cálculo de poder amostral foi realizado com o auxílio do programa *G Power* versão 3.1.9.2. Estimamos uma amostra entre 100-150 indivíduos por grupo determinarão um poder estatístico entre 85-95%. Existem poucos

trabalhos na literatura com ELT-EH que abordam estes conjuntos de polimorfismos. O cálculo amostral foi realizado com informações destes trabalhos e de outras patologias, como esquizofrenia e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). O estudo de Al Omar et al. (Al Omar et al., 2015) foi realizado com 100-160 indivíduos participantes por grupo, para um poder estatístico de 85-95%. Qian et al. (Qian et al., 2004) mostraram que seriam necessários 135 indivíduos por grupo, para análise dos polimorfismos do D4 e 168 indivíduos para análise dos polimorfismos do DAT. No estudo de Arab & Elhawary (Arab e Elhawary, 2015) foram necessários 105 indivíduos para comparação das frequências alélicas nos pacientes com esquizofrenia, com um poder estatístico de 95%.

O trabalho de Sander et al. (Sander et al., 2000) que descreve o polimorfismo 3'UTR do gene do DAT nas EGGD estudou 133 pacientes, dados que corroboram os valores propostos no presente estudo.

5. RESULTADOS

Para as distribuições genótípicas dos polimorfismos dos receptores, não há diferença entre os grupos; DRD2 rs1800497 ($p = 0,440$); DRD4 rs1800955 ($p = 0,548$) e DRD4 VNTR ($p = 0,318$).

Não observamos diferença entre os grupos para os polimorfismos COMT rs4680 ($p = 0,482$) e MAOA_uVNTR ($p = 0,753$), relacionados à metabolização de DA.

Não encontramos diferenças no polimorfismo do Intron 8 VNTR ($p = 0,395$) e 3'UTR VNTR ($p = 0,614$), que estão relacionados ao gene DAT. Na análise da frequência do haplótipo do gene DAT (3'UTR e Intron 8), não houve diferença entre os grupos ($p = 0,205$). Para o polimorfismo Val66Met (rs6265) do BDNF não houve diferença entre os grupos ($p = 0,636$). Não houve diferença na distribuição alélica Val66Met (teste qui-quadrado = 0,519, $df = 1$, $p\text{-value} = 0,4711$) no grupo ELT-EH.

As distribuições genótípicas e alélicas dos polimorfismos estão descritas abaixo.

5.1 Polimorfismos dos receptores dopaminérgicos

Em relação aos polimorfismos dos receptores dopaminérgicos - DRD2 rs1800497 ($p = 0,440$), DRD4 rs1800955 ($p = 0,548$) e DRD4 VNTR ($p = 0,318$) - não houve diferença entre os pacientes e voluntários saudáveis. (Tabela 3)

Tabela 3. Distribuição genotípica dos polimorfismos dos receptores dopaminérgicos.

Polimorfismos dos receptores	Genótipo	Controle (n= 113)		ELT-EH (n=119)		ELT-EH vs Controle
		N	%	n	%	p-value
DRD2_rs1800497	CC	13	11.8	19	16.5	0.440 ⁴
	CT	39	35.5	44	38.3	
	TT	58	52.7	52	45.2	
DRD4_rs1800955	CC	22	20	29	25.7	0.548 ⁴
	CT	49	44.5	44	38.9	
	TT	39	35.5	40	35.4	
DRD4_VNTR	L/L ¹	7	6.9	3	2.8	0.318 ⁵
	L/C ²	23	22.8	21	19.8	
	C/C ³	71	70.3	82	77.4	

¹ Genótipos homozigotos com ≥ 7 repetições; ² Genótipos heterozigoto com ≤ 6 repetições e ≥ 7 repetições; ³ Genótipos homozigotos com ≤ 6 repetições; ⁴ Teste Chi-quadrado; ⁵ Teste exato de Fisher's.

5.2. Polimorfismos dos metabolizadores da dopamina

Em relação aos polimorfismos metabolizadores enzimáticos de dopamina - COMT rs4680 (p= 0,482) e MAOA_u VNTR - não houve diferença (p = 0,753) entre os pacientes com ELT-EH e os voluntários saudáveis. (Tabela 4)

Tabela 4. Distribuição genotípica dos polimorfismos metabolizadores enzimáticos da dopamina.

Polimorfismos metabolizadores	Genótipo	Controle (n= 113)		ELT-EH (n=119)		ELT-EH vs Controle
		N	%	N	%	
MAOA_uVNTR	Alto ¹	82	72.6	82	70.7	0.753 ³
	Baixo ²	31	27.4	34	29.3	
COMT_rs4680	AA	26	23	22	19	0.482 ³
	AG	42	37.2	52	44.8	
	GG	45	39.8	42	36.2	

¹ Genótipo homozigoto com alelos de alta atividade transcricional; ² Genótipo homozigoto com alelos com baixa atividade transcricional; ³ Teste de Qui-quadrado.

5.3 Polimorfismos relacionados ao gene DAT

Não houve diferença entre pacientes com ELT-EH e controles em relação aos polimorfismos que estão associados ao gene DAT - 3'UTR VNTR (p= 0,614) e Intron 8 VNTR (p = 0,395). (Tabela 5)

Tabela 5. Distribuição genotípica dos polimorfismos relacionados ao DAT.

DAT	Genótipo	Controle (n= 113)		ELT-EH (n=119)		ELT-EH vs Controle p
		N	%	N	%	
3'UTR_VNTR	10R/10R	57	52.7	53	51.4	0.614 ¹
	9R/10R	40	37.0	35	33.9	
	9R/9R	11	10.1	15	14.5	
IN8_VNTR	5R/5R	13	12.4	19	17.7	0.395 ²
	5R/6R	43	41.0	41	38.3	
	6R/6R	49	46.7	45	42.0	
	6R/7R	0	0	2	1.8	

¹ Teste Chi-quadrado; ² Teste exato de Fisher's.

5.4 Polimorfismos haplótipos do gene DAT - 3'UTR e Intron 8

Não observamos diferença entre os pacientes com ELT-EH e os voluntários saudáveis na análise dos haplótipos do gene DAT os polimorfismos da região 3'UTR e Intron 8 ($p = 0,205$). (Tabela 6)

Tabela 6. Distribuição em frequência dos haplótipos dos polimorfismos avaliados do gene DAT - 3'UTR e Intron 8.

3UTR_VNTR	IN8_VNTR	Controle	ELT-EH	Total
10R	6R	52.7%	42.5%	47.4%
10R	5R	17.7%	15.1%	16.4%
9R	5R	15.3%	15.4%	15.2%
9R	6R	10.5%	16.6%	13.7%
10R	7R	1.4%	4.0%	2.8%
8R	5R	0.5%	3.1%	1.8%
8R	6R	1.4%	1.3%	1.4%
9R	7R	0.5%	1.0%	0.8%
8R	7R	0.0%	1.0%	0.5%

5.5 Polimorfismo Val66Met do gene BDNF

Não houve diferença entre os pacientes com ELT-EH e os voluntários saudáveis para o polimorfismo Val66Met (rs6265) do BDNF ($p = 0,636$).

Não observamos diferença na distribuição alélica Val66Met (teste qui-quadrado = 0,519, $df = 1$, $p\text{-value} = 0,4711$) no grupo ELT-EH.(Tabela 7)

Tabela 7. Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo avaliado Val66Met.

Polimorfismo	Genótipo	Controle (n= 113)		ELT-EH (n=119)		ELT-EH vs Controle
		N	%	N	%	p-value
BDNF_rs6265	Met\Met	3	2.7	2	1.8	0.636 ¹
	Val\Met	22	19.8	28	24.8	
	Val\Val	86	77.5	83	73.5	
Alelo		N	%	N	%	
BDNF_rs6265	Met	27	12.3	33	14.6	0.471 ²
	Val	193	87.7	193	85.4	

¹ Teste exato de Fisher; ² Teste Qui-quadrado.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, abordamos um grupo etiologicamente homogêneo, ou seja, somente pacientes com ELT-EH. Não há estudos que versem sobre os polimorfismos da via dopaminérgica neste grupo de pacientes. Os estudos anteriores abordam predominantemente a via serotoninérgica com amostras heterogêneas de pacientes com ELT, incluindo pacientes com tumores, displasias, gliose e EH. A abordagem de grupos heterogêneos nos estudos de polimorfismos não nos parece adequada pelas diferenças determinadas pela etiologia.

Na caracterização dos grupos, houve diferença entre o grupo ELT-EH e voluntários saudáveis quanto à idade média, sendo os pacientes com ELT-EH apresentaram idade média maior que os controles. Esta diferença está associada a nossa dificuldade de recrutar voluntários saudáveis com idade acima de 40 anos.

Não houve diferença entre os grupos considerando gênero e os pacientes e voluntários saudáveis foram etnicamente homogêneos. É importante salientar que a população brasileira é composta por 195 milhões de pessoas e tem raízes ancestrais importantes na Europa, África e América. O contexto genético da população brasileira é menos heterogêneo do que se acreditava anteriormente, com alta porcentagem caucasiana (60-77%), especialmente nas regiões Sul e Sudeste (Pena et al., 2011; Schenkel et al., 2012).

6.1 Polimorfismos do DAT

No nosso estudo, analisamos duas regiões altamente polimórficas do gene DAT. Observamos que o genótipo 10R/10R foi comum para a região 3'UTR para o grupo ELT-EH. O primeiro é um *VNTR* comum de 40 pares de bases na região 3'UTR com variações entre 3 a 13 repetições, sendo o alelo mais comum de 10 repetições, como observado no nosso estudo. Há evidências de que a região 3'UTR pode influenciar na regulação da transcrição e na tradução do gene DAT (Mill et al., 2002), porém sua função biológica ainda é desconhecida.

Observamos, ainda, que o genótipo 6R / 6R foi comum na região do Intron 8 para o grupo ELT-EH. Este *VNTR* é uma repetição de 30 pares de bases no Intron 8 do gene DAT, sendo as formas mais comuns os alelos de 5 e 6 repetições. (Brookes et al., 2007)

Foi relatado que o alelo de 3 repetições, quando comparado com 2 repetições, tem uma expressão basal reduzida, mas pode ser mais facilmente induzido e atingir níveis de expressão mais elevados (Brookes et al., 2007).

Há apenas um estudo abordando o DAT nos pacientes com epilepsia generalizada geneticamente determinada (EGGD) que avaliou 133 indivíduos (Sander et al., 2000). Neste estudo houve maior frequência do alelo de 9 repetições do polimorfismo 3'UTR do gene DAT, que esteve significativamente aumentado nos pacientes com EGGD. O tipo de epilepsia estudada, provavelmente, desempenha um papel significativo nas diferenças observadas no nosso estudo em comparação com o estudo anterior realizado por Sander et. al (Sander et al., 2000).

6.2 Haplótipos do gene DAT

Nós identificamos 5 haplótipos (10R-6R, 10R-5R, 9R-5R, 9R-6R e 10R-7R) que tiveram uma frequência superior a 2% na nossa amostra, enquanto outros (8R-5R, 8R-6R, 9R-7R e 8R-7R) foram considerados haplótipos raros. O haplótipo 10R-6R foi o mais comum, representando 47,4% da nossa amostra. A importância da análise de frequência de haplótipos está relacionada ao desequilíbrio de ligação (DL). A escolha pelas regiões 3'UTR e do Intron 8 foi realizada pelas evidências de que estas são regiões altamente polimórficas que podem estar relacionadas a um desequilíbrio na expressão do gene (Hawi et al., 2009). Nossos resultados para o haplótipo do gene DAT não indicam relação entre os polimorfismos estudados e a presença de ELT-EH.

6.3 Receptores dopaminérgicos

Há evidências de que os receptores dopaminérgicos estão relacionados à epileptogênese (Werhahn et al., 2006; Landvogt et al., 2010; Rocha et al., 2012; Revisão em Bozzi e Borrelli, 2013). A diminuição da função do receptor D2 pode estar envolvida na epilepsia límbica (Revisão em Bozzi e Borelli, 2013). A sinalização do receptor D2 alterado pode contribuir para a epileptogênese através da ativação de cascatas de morte de células neuronais. Em nosso estudo, a análise do polimorfismo DRD2 rs1800497 não esteve associada a ELT-EH. Observou-se uma alta porcentagem dos portadores de alelos T - 45,2% no grupo ELT-EH, embora sem significância estatística. Ritchie e Noble (Ritchie e Noble, 2003) postularam que os portadores do alelo T mostram uma redução de 30% dos sítios de ligação para este receptor dopaminérgico. Estes resultados foram associados à redução dos sítios de

ligação da dopamina no cérebro de indivíduos alcoólicos e não alcoólicos. Esta diminuição pode ser mais proeminente no sistema límbico, onde este receptor é mais abundante. Este polimorfismo também foi associado com a maior frequência de efeitos adversos psiquiátricos ao uso de LEV nos pacientes com síndromes epiléticas distintas. Os autores observaram uma diminuição da atividade dopaminérgica relacionada a polimorfismos rs1611115 (DBH), rs4680 (COMT) e rs1800497 (DRD2 TAQL A-1A) (Helmstaedter et al., 2013).

Outro membro da família dos receptores dopaminérgicos é o D4, que possui um polimorfismo do tipo *VNTR* com 48 pares de bases no éxon 3. Este é expresso em várias regiões do cérebro, incluindo estruturas límbicas (Van Tol Et al., 1991; Asghari et al., 1995). O DRD4 *VNTR* tem um papel inibidor proeminente na hiperexcitabilidade neuronal (Asghari et al., 1995). As variações alélicas variam são entre 2 a 11 repetições, sendo os alelos mais comuns os de 2-4 (alelo curto) repetições e 7 (alelo longo) repetições. O alelo curto foi a variação mais comum no nosso estudo representando 77,4% do grupo ELT-EH dos nossos resultados. Nossos resultados mostraram poucos casos de genótipos longos, embora a relevância funcional do alelo longo do DRD4 não esteja clara.

6.4 Metabolizadores da dopamina - COMT e MAOA

Para o polimorfismo da COMT rs4680, o grupo ELT-EH apresentou 36,2% da variante de valina e apenas 19% deste grupo foi homozigoto para a variante de metionina. Essas variações causam diferenças na concentração cortical de dopamina e afetam processos relacionados à cognição. O genótipo Met / Met tem sido implicado com uma maior concentração de dopamina

(Golimbet et al., 2007). Por outro lado, o genótipo Val / Val está associado a menor concentração de dopamina (Reuter e Hennig, 2005).

O polimorfismo da MAOA-uVNTR tem sido amplamente estudado e sabe-se que este polimorfismo pode afetar a expressão gênica (Sabol et al., 1998). No grupo ELT-EH, o genótipo mais comum foi aquele relacionado com alta atividade transcricional, porém as variantes foram distribuídas de forma semelhante entre os pacientes com ELT-EH e os controles. Em resumo, os polimorfismos relacionados à metabolização da dopamina não foram associados à epileptogênese na ELT-EH.

6.5 BDNF

Outro objetivo deste estudo foi avaliar o polimorfismo do gene BDNF - o Val66Met - e sua relação com a ELT-EH.

Kanemoto et al. (Kanemoto et al., 2003) foi o primeiro a avaliar a importância do BDNF na epilepsia. No entanto, estes autores observaram outra região polimórfica do gene BDNF e sugerem que o alelo T, na região 240 do gene BDNF, pode ser um marcador genético que indica uma susceptibilidade aumentada às crises epiléticas, mas não na posição 480 da sequência pró-BDNF. O BDNF é inicialmente sintetizado como um precursor (pró-BDNF), que é posteriormente clivado para gerar BDNF maduro (m-BDNF). O pró-BDNF é exclusivamente localizado intracelularmente, sendo um precursor inativo, como todas as neurotrofinas. No entanto, alguns estudos corroboram que a secreção de pró-BDNF e a sua conversão para m-BDNF *in vitro* sugere que o pró-BDNF pode ser biologicamente ativo (Pang et al., 2004). Lohoff et al. (Lohoff et al., 2005), replicou o estudo de Kanemoto et al. (Kanemoto et al., 2003), somente

com pacientes ELT de diversas etiologias, com ascendência europeia, porém não houve associação.

No estudo de Louhivuori et al. (2009), o polimorfismo Val66Met esteve associado ao desenvolvimento da epilepsia na síndrome do X frágil. No estudo de Bragatti et al. (2010) investigaram a importância do polimorfismo Val66Met na ELT e as suas principais manifestações clínicas. Estes autores não identificaram qualquer associação entre as variantes do BDNF Val66Met e as variáveis clínicas da ELT. No estudo de Nectoux et al. (2008), os autores concluíram que o polimorfismo Val66Met do BDNF poderia reduzir o risco de crises epiléticas na síndrome de Rett.

No último estudo relacionado ao polimorfismo Val66Met e epilepsia (Shen et al., 2015) a frequência do alelo Met foi pequena nos pacientes com ELT quando comparados aos controles (43,9% vs 48,6%, $p = 0,012$). Os portadores do alelo Met e a frequência no grupo ELT-EH foram significativamente inferiores aos não transportadores (20,5% vs 29,1%, $p = 0,040$). No entanto, não houve diferença entre o genótipo e a assimetria do hipocampo. Segundo os autores, o polimorfismo Val66Met poderia estar correlacionado com a epileptogênese e o alelo Met66 poderia desempenhar um papel protetor contra a ocorrência de ELT. Não pudemos corroborar este achado nesta amostra de pacientes com ELT-EH.

6.6 Limitações do estudo

Neste estudo, nos concentramos em um painel restrito de variantes relevantes nos genes da via dopaminérgica. Por este motivo, não podemos excluir a possibilidade de novas associações em outros loci. Os estudos de associação têm limites sutis e tendências inerentes a este tipo de análise

(Cardell e Clayton, 2005). A diversidade étnica, os fatores ambientais e o tamanho da amostra podem desafiar a identificação de variantes genéticas relacionadas à epilepsia. Esses fatores também podem ser responsáveis pelas dificuldades de reproduzir os resultados obtidos em estudos anteriores. Como ressaltado anteriormente, este é o primeiro estudo de polimorfismos relacionados à via dopaminérgica com uma amostra homogênea de ELT-EH, o que o distingue dos estudos anteriores quanto à vários fatores que possam implicar na análise das variantes genéticas.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem concluir que:

1. Não houve diferença nas frequências dos polimorfismos 3'UTR e Intron 8 do gene DAT e na análise dos haplótipos (DAT 3'UTR VNTR e Intron 8 VNTR) quando comparamos os grupos ELT-EH e voluntários saudáveis.
2. Não houve diferença entre ELT-EH e voluntários saudáveis quanto ao polimorfismo que codifica a MAOA.
3. Não houve diferença em relação aos polimorfismos dos receptores de dopamina (D2 rs1800497, D4 rs1800955 e DRD4 VNTR) nos pacientes com ELT-EH e voluntários saudáveis.
4. Não houve associação entre polimorfismos do gene que codifica a COMT rs4680 entre ELT-EH e voluntários saudáveis.
5. O BDNF (Val66Met) foi similar nos grupos ELT-EH e voluntários saudáveis.

Portanto, não evidenciamos a presença de polimorfismos relacionados à via dopaminérgica no grupo ELT-EH. Neste contexto, os polimorfismos da via dopaminérgica estudados podem não influenciar na excitabilidade da rede neural e contribuir para a presença de ELT-EH.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. abril de 2014;55(4):475–82.
2. Hauser WA, Rich SS, Lee JR, Annegers JF, Anderson VE. Risk of recurrent seizures after two unprovoked seizures. *N Engl J Med*. 12 de fevereiro de 1998;338(7):429–34.
3. Sander JW, Shorvon SD. Epidemiology of the epilepsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. novembro de 1996;61(5):433–43.
4. Placencia M, Sander JW, Shorvon SD, Ellison RH, Cascante SM. Validation of a screening questionnaire for the detection of epileptic seizures in epidemiological studies. *Brain*. junho de 1992;115 (Pt 3):783–94.
5. Placencia M, Shorvon SD, Paredes V, Bimos C, Sander JW, Suarez J, et al. Epileptic seizures in an Andean region of Ecuador. Incidence and prevalence and regional variation. *Brain*. junho de 1992;115 (Pt 3):771–82.
6. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. abril de 2010;51(4):676–85.
7. Bouchet C, Cazauvieilh CA. De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale. Recherche sur la nature et le siège de ces deux maladies. *Arch Gen Med*. 1825:510–542.

8. Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, et al. Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology*. junho de 1993;43(6):1083–7.
9. Novy J, Bartolini E, Bell GS, Duncan JS, Sander JW. Long-term retention of lacosamide in a large cohort of people with medically refractory epilepsy: a single centre evaluation. *Epilepsy Res*. setembro de 2013;106(1–2):250–6.
10. Cendes F. Febrile seizures and mesial temporal sclerosis. *Curr Opin Neurol*. abril de 2004;17(2):161–4.
11. Sofroniew M V, Vinters H V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. janeiro de 2010;119(1):7–35.
12. 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*. julho de 2013;54(7):1315–29.
13. American Psychiatric Association (APA). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision*. Washington DC; 2000.
14. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. abril de 2017;58(4):522–30.
15. Schulz R, Lüders HO, Hoppe M, Jokeit H, Moch A, Tuxhorn I, et al. Lack of aura experience correlates with bitemporal dysfunction in mesial

- temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* março de 2001;43(3):201–10.
16. Loddenkemper T, Kotagal P. Lateralizing signs during seizures in focal epilepsy. *Epilepsy Behav.* agosto de 2005;7(1):1–17.
 17. Saygi S, Spencer SS, Scheyer R, Katz A, Mattson R, Spencer DD. Differentiation of temporal lobe ictal behavior associated with hippocampal sclerosis and tumors of temporal lobe. *Epilepsia.* 35(4):737–42.
 18. Privitera MD, Morris GL, Gilliam F. Postictal language assessment and lateralization of complex partial seizures. *Ann Neurol.* setembro de 1991;30(3):391–6.
 19. Engel J, Pedley TA, Aicardy J, Dichter MA. *Epilepsy: a comprehensive textbook.* 2nd ed. Lippincott: Williams & Wilkins; 2007.
 20. Duncan JS. Imaging and epilepsy. *Brain.* fevereiro de 1997;120 (Pt 2):339–77.
 21. Jackson GD, Kuzniecky RI, Cascino GD. Hippocampal sclerosis without detectable hippocampal atrophy. *Neurology.* janeiro de 1994;44(1):42–6.
 22. Janszky J, Pannek HW, Janszky I, Schulz R, Behne F, Hoppe M, et al. Failed surgery for temporal lobe epilepsy: predictors of long-term seizure-free course. *Epilepsy Res.* 64(1–2):35–44.
 23. Nemoda Z, Szekely A, Sasvari-Szekely M. Psychopathological aspects of dopaminergic gene polymorphisms in adolescence and young adulthood. *Neurosci Biobehav Rev.* agosto de 2011;35(8):1665–86.
 24. Starr, M.S. (1993). Regulation of seizure thresholds by D1 versus D2 receptors, in *D1/D2 Dopamine Receptor Interactions*, ed. J. Waddington. New York: Academic Press, 235–269.

25. Starr MS. The role of dopamine in epilepsy. *Synapse*. fevereiro de 1996;22(2):159–94.
26. Bagdy G, Kecskemeti V, Riba P, Jakus R. Serotonin and epilepsy. *J Neurochem*. 2007;100(4):857–73.
27. Rektor I, Kuba R, Brázdil M, Chrastina J. Do the basal ganglia inhibit seizure activity in temporal lobe epilepsy? *Epilepsy Behav*. setembro de 2012;25(1):56–9.
28. Biraben A, Semah F, Ribeiro M-J, Douaud G, Remy P, Depaulis A. PET evidence for a role of the basal ganglia in patients with ring chromosome 20 epilepsy. *Neurology*. 13 de julho de 2004;63(1):73–7.
29. Del Sole A, Chiesa V, Lucignani G, Vignoli A, Giordano L, Lecchi M, et al. Exploring dopaminergic activity in ring chromosome 20 syndrome: a SPECT study. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. outubro de 2010;54(5):564–9.
30. Bouilleret V, Semah F, Biraben A, Taussig D, Chassoux F, Syrota A, et al. Involvement of the basal ganglia in refractory epilepsy: an 18F-fluoro-L-DOPA PET study using 2 methods of analysis. *J Nucl Med*. março de 2005;46(3):540–7.
31. Bouilleret V, Semah F, Chassoux F, Mantzarides M, Biraben A, Trebossen R, et al. Basal ganglia involvement in temporal lobe epilepsy: a functional and morphologic study. *Neurology*. 15 de janeiro de 2008;70(3):177–84.
32. Ciumas C, Wahlin T-BR, Jucaite A, Lindstrom P, Halldin C, Savic I. Reduced dopamine transporter binding in patients with juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology*. 9 de setembro de 2008;71(11):788–94.
33. Odano I, Varrone A, Savic I, Ciumas C, Karlsson P, Jucaite A, et al. Quantitative PET analyses of regional [11C]PE2I binding to the dopamine

- transporter--application to juvenile myoclonic epilepsy. *Neuroimage*. 15 de fevereiro de 2012;59(4):3582–93.
34. Ciumas C, Wahlin T-BR, Espino C, Savic I. The dopamine system in idiopathic generalized epilepsies: identification of syndrome-related changes. *Neuroimage*. junho de 2010;51(2):606–15.
 35. Werhahn KJ, Landvogt C, Klimpe S, Buchholz H-G, Yakushev I, Siessmeier T, et al. Decreased dopamine D2/D3-receptor binding in temporal lobe epilepsy: an [18F]fallypride PET study. *Epilepsia*. agosto de 2006;47(8):1392–6.
 36. Landvogt C, Buchholz H-G, Bernedo V, Schreckenberger M, Werhahn KJ. Alteration of dopamine D2/D3 receptor binding in patients with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia*. setembro de 2010;51(9):1699–706.
 37. 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*. janeiro de 2012;45(1):499–507.
 38. Meurs A, Clinckers R, Ebinger G, Michotte Y, Smolders I. Seizure activity and changes in hippocampal extracellular glutamate, GABA, dopamine and serotonin. *Epilepsy Res*. janeiro de 2008;78(1):50–9.
 39. Cifelli P, Grace AA. Pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy in the rat is associated with increased dopamine neuron activity. *Int J Neuropsychopharmacol*. 12 de agosto de 2012;15(7):957–64.
 40. Bozzi, Y., Dunleavy, M., and Hen- shall, D. (2011). Cell signaling underlying epileptic behavior. *Front.Behav.Neurosci*.5:45. doi:

10.3389/fnbeh.2011.00045

41. Bozzi Y, Borrelli E. The role of dopamine signaling in epileptogenesis. *Front Cell Neurosci.* 2013;7.
42. Rubinstein M, Cepeda C, Hurst RS, Flores-Hernandez J, Ariano MA, Falzone TL, et al. Dopamine D4 receptor-deficient mice display cortical hyperexcitability. *J Neurosci.* 1 de junho de 2001;21(11):3756–63.
43. Lauder JM. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.* junho de 1993;16(6):233–40.
44. Grandy DK, Marchionni MA, Makam H, Stofko RE, Alfano M, Frothingham L, et al. Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* dezembro de 1989;86(24):9762–6.
45. Noble EP. The DRD2 gene in psychiatric and neurological disorders and its phenotypes. *Pharmacogenomics.* agosto de 2000;1(3):309–33.
46. Wood H. Epilepsy: Psychiatric adverse effects of levetiracetam linked to genetic variation in dopamine signalling. *Nat Rev Neurol.* 2012;8(10):532.
47. Helmstaedter C, Mihov Y, Tolia MR, Thiele H, Nuernberg P, Schoch S, et al. Genetic variation in dopaminergic activity is associated with the risk for psychiatric side effects of levetiracetam. *Epilepsia.* 2013;54(1):36–44.
48. Helmstaedter C, Mihov Y, Tolia MR, Thiele H, Nuernberg P, Schoch S, et al. Genetic variation in dopaminergic activity is associated with the risk for psychiatric side effects of levetiracetam. *Epilepsia.* janeiro de 2013;54(1):36–44.
49. Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, et al. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high

- affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*. 18 de abril de 1991;350(6319):610–4.
50. Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HH. Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J Neurochem*. setembro de 1995;65(3):1157–65.
 51. Lichter JB, Barr CL, Kennedy JL, Van Tol HH, Kidd KK, Livak KJ. A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Hum Mol Genet*. junho de 1993;2(6):767–73.
 52. Vandenberg DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, et al. Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics*. dezembro de 1992;14(4):1104–6.
 53. Sander T, Berlin W, Ostapowicz A, Samochowiec J, Gscheidel N, Hoehe MR. Variation of the genes encoding the human glutamate EAAT2, serotonin and dopamine transporters and Susceptibility to idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res*. agosto de 2000;41(1):75–81.
 54. Mill J, Asherson P, Browes C, D'Souza U, Craig I. Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3' UTR VNTR: Evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. *Am J Med Genet*. 8 de dezembro de 2002;114(8):975–9.
 55. Brookes KJ, Neale BM, Sugden K, Khan N, Asherson P, D'Souza UM. Relationship between VNTR polymorphisms of the human dopamine transporter gene and expression in post-mortem midbrain tissue. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 5 de dezembro de 2007;144B(8):1070–8.

56. Sabol SZ, Hu S, Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet.* setembro de 1998;103(3):273–9.
57. Deckert J, Catalano M, Syagailo Y V, Bosi M, Okladnova O, Di Bella D, et al. Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet.* abril de 1999;8(4):621–4.
58. Denney RM, Koch H, Craig IW. Association between monoamine oxidase A activity in human male skin fibroblasts and genotype of the MAOA promoter-associated variable number tandem repeat. *Hum Genet.* dezembro de 1999;105(6):542–51.
59. Balciuniene J, Emilsson L, Orelund L, Pettersson U, Jazin E. Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. *Hum Genet.* janeiro de 2002;110(1):1–7.
60. Chen X, Wang X, O'Neill AF, Walsh D, Kendler KS. Variants in the catechol-o-methyltransferase (COMT) gene are associated with schizophrenia in Irish high-density families. *Mol Psychiatry.* outubro de 2004;9(10):962–7.
61. Golimbet VE, Alfimova M V, Gritsenko IK, Ebstein RP. Relationship between dopamine system genes and extraversion and novelty seeking. *Neurosci Behav Physiol.* julho de 2007;37(6):601–6.
62. Reuter M, Hennig J. Association of the functional catechol-O-methyltransferase VAL158MET polymorphism with the personality trait of extraversion. *Neuroreport.* 13 de julho de 2005;16(10):1135–8.
63. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677–736.

64. Thoenen H. The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* maio de 1991;14(5):165–70.
65. Kandravicius L, Monteiro MR, Silva RA do V, Leite JP. Neurotrofinas na epilepsia do lobo temporal. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* 2010;16(1):7–12.
66. Gall CM. Seizure-induced changes in neurotrophin expression: implications for epilepsy. *Exp Neurol.* novembro de 1993;124(1):150–66.
67. Garcia ML, Garcia VB, Isackson PJ, Windebank AJ. Long-term alterations in growth factor mRNA expression following seizures. *Neuroreport.* 14 de abril de 1997;8(6):1445–9.
68. de Lanerolle NC, Lee T-S. New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* setembro de 2005;7(2):190–203.
69. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell.* 24 de janeiro de 2003;112(2):257–69.
70. Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, et al. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science.* 31 de outubro de 2003;302(5646):890–3.
71. Bovolenta R, Zucchini S, Paradiso B, Rodi D, Merigo F, Navarro Mora G, et al. Hippocampal FGF-2 and BDNF overexpression attenuates epileptogenesis-associated neuroinflammation and reduces spontaneous recurrent seizures. *J Neuroinflammation.* 18 de novembro de 2010;7:81.
72. Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too

- much of a good thing? Trends Neurosci. janeiro de 2001;24(1):47–53.
73. Kanemoto K, Kawasaki J, Tarao Y, Kumaki T, Oshima T, Kaji R, et al. Association of partial epilepsy with brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphisms. Epilepsy Res. março de 2003;53(3):255–8.
 74. Laitinen J, Samarut J, Hölttä E. A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. Biotechniques. agosto de 1994;17(2):316, 318, 320–2.
 75. Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW, et al. Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. Science. 2 de agosto de 2002;297(5582):851–4.
 76. Mallard TT, Doorley J, Esposito-Smythers CL, McGeary JE. Dopamine D4 receptor VNTR polymorphism associated with greater risk for substance abuse among adolescents with disruptive behavior disorders: Preliminary results. Am J Addict. janeiro de 2016;25(1):56–61.
 77. Epstein MP, Satten GA. Inference on haplotype effects in case-control studies using unphased genotype data. Am J Hum Genet. dezembro de 2003;73(6):1316–29.
 78. Al Omar SY, Mansour L, Alkhuriji AF, Alwasel S, Al-Qahtani S. Genetic association between the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism and the recurrent spontaneous abortions in Saudi Arabian women. Genet Mol Res. 23 de janeiro de 2015;14(1):286–93.
 79. Qian Q, Wang Y, Zhou R, Yang L, Faraone S V. Family-based and case-control association studies of DRD4 and DAT1 polymorphisms in Chinese attention deficit hyperactivity disorder patients suggest long repeats contribute to genetic risk for the disorder. Am J Med Genet. 1 de julho de

- 2004;128B(1):84–9.
80. Arab AH, Elhawary NA. Association between ANKK1 (rs1800497) and LTA (rs909253) Genetic Variants and Risk of Schizophrenia. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1–8.
 81. Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, et al. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science.* 15 de outubro de 2004;306(5695):487–91.
 82. Lohoff FW, Sander T, Ferraro TN, Dahl JP, Gallinat J, Berrettini WH. Confirmation of association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar I disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 5 de novembro de 2005;139B(1):51–3.
 83. Louhivuori V, Arvio M, Soronen P, Oksanen V, Paunio T, Castrén ML. The Val66Met polymorphism in the BDNF gene is associated with epilepsy in fragile X syndrome. *Epilepsy Res.* julho de 2009;85(1):114–7.
 84. Bragatti JA, Schenkel LC, Torres CM, Manfro GG, Blaya C, Souza AC de, et al. No major clinical impact of Val66Met BDNF gene polymorphism on temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* fevereiro de 2010;88(2–3):108–11.
 85. Nectoux J, Bahi-Buisson N, Guellec I, Coste J, De Roux N, Rosas H, et al. The p.Val66Met polymorphism in the BDNF gene protects against early seizures in Rett syndrome. *Neurology.* 27 de maio de 2008;70(22 Pt 2):2145–51.
 86. Shen N, Zhu X, Lin H, Li J, Li L, Niu F, et al. Role of BDNF Val66Met functional polymorphism in temporal lobe epilepsy. *Int J Neurosci.*

2015;1–16.

87. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *Lancet* (London, England). 366(9491):1121–31.