UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da expressão da Glicoproteína-P e sua influência na
concentração de antiepilépticos no córtex temporal de pacientes com
epilepsia refratária

Flavia Isaura de Santi Ferreira

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da expressão da Glicoproteína-P e sua influência na
concentração de antiepiléticos no córtex temporal de pacientes com
epilepsia refratária

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Flavia Isaura de Santi Ferreira
Orientadora: Profª Drª Regina Helena Costa Queiroz
Coorientador: Prof. Dr. Veriano Alexandre Junior

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Toxicologia em 07/05/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E
PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ferreira, Flavia Isaura de Santi

Avaliação da expressão da Glicoproteína-P e sua influência na
concentração de antiepilépticos no córtex temporal de
pacientes com epilepsia refratária. Ribeirão Preto, 2015.

64p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Toxicologia.

Orientadora: Queiroz, Regina Helena Costa

1. Epilepsia. 2. Fármaco-resistência. 3. Glicoproteína-P.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flavia Isaura de Santi Ferreira

Avaliação da expressão da Glicoproteína-P e sua influência na concentração de antiepilépticos no córtex temporal de pacientes com epilepsia refratária

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa Dra Regina Helena Costa Queiroz

Coorientador: Prof. Dr. Veriano Alexandre Junior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Para minha mãe e irmã, queridas e amadas, Flavia de Cassia e Cassia Elisa. Sem
você eu não seria a pessoa que sou hoje;

Para meu sobrinho e afilhado Enzo, que tanto amo.

A todos os familiares que me acompanharam durante o Doutorado, contribuindo
com paciência e compreensão.

Para meu namorado e amigo Gabriel Pietro, sempre presente, paciente e atencioso.

Agradecimentos

Em primeiro lugar à minha orientadora Professora Regina Queiroz, que sempre acreditou em mim, me ajudou e incentivou.

Ao meu coorientador Doutor Veriano Alexandre Junior por toda a ajuda intelectual e prática dentro do Hospital das Clínicas da FMRP – USP.

Aos voluntários e familiares que aceitaram participar desse estudo, pois sem eles a pesquisa científica não existiria.

À farmacêutica responsável pelo laboratório de Análises Toxicológicas, Sônia Carvalho, por toda a ajuda e companheirismo; e à Gilda Gatto, pela ajuda com as análises para esse trabalho.

A toda a equipe do CIREP (Centro de Cirurgia em Epilepsia) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, e especialmente às secretárias Elídia Magnani e Adriana Nogueira pela ajuda e paciência durante a seleção e conversa com os pacientes incluídos no estudo.

Aos cirurgiões e residentes do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP –USP e à equipe de enfermagem do Centro Cirúrgico do Hospital das Clínicas da FMRP – USP por todo auxílio e atenção durante a realização deste projeto.

À equipe do Serviço de Verificação de Óbito do interior, especialmente à secretária Regina e aos técnicos por toda a paciência, boa vontade e disponibilidade.

Ao Doutor Alexandre Ferro Aissa, por toda disponibilidade e boa vontade durante a realização do presente trabalho.

Às secretárias da Pós-Graduação Rosemary Ioshimine Gerolineto e Rosana Ferreira Leite dos Santos Florencio por todo o auxílio durante os anos que convivemos.

Aos meus colegas da Pós-Graduação Dr^a Priscila de Freitas Lima, Dr^a Marina Salviato Balbão, Dr André Baldoni e Dr Mateus Bergamaschi, que tanto me auxiliaram pessoal e profissionalmente.

À CAPES pela bolsa de estudos; À Pró-Reitoria de Pós-Graduação pelo auxílio financeiro que viabilizou minha participação no *4th Eilat International Educational Course: Pharmacological Treatment Of Epilepsy* em Israel no ano de 2011 e à FCFRP e FAPESP por ceder a verba necessária para a compra de materiais

E para todos que, de alguma forma, participaram de minha formação acadêmico-científica, pois cada experiência e discussão contribuíram para meu amadurecimento profissional e pessoal.

Muito obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

FERREIRA, F. I. S. **Avaliação da expressão da Glicoproteína-P e sua influência na concentração de antiepilépticos no córtex temporal de pacientes com epilepsia refratária.** 2015. 64f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A epilepsia, doença descrita pela primeira vez em 2000 a.C., tem a crise convulsiva ou epilética como fenômeno paroxístico, e a International League Against Epilepsy define a crise epilética como “manifestação excessiva e/ou hipsincrônica, normalmente autolimitada, da atividade dos neurônios no cérebro”. Há 40 anos surgiram os medicamentos antiepilépticos, mas a resistência múltipla a fármacos antiepilépticos (FAEs) é um problema significativo que afeta pelo menos 30% dos pacientes portadores dessa doença devastadora. O mecanismo exato da fármaco-resistência desenvolvida em pacientes epiléticos ainda é desconhecido, porém uma possível causa seria a inadequada acumulação intraparenquimal do fármaco antiepiléptico relacionada a expressão aumentada da glicoproteína-P (PgP). Neste contexto, nosso objetivo foi investigar a correlação da expressão da PgP, codificada pelo gene ABCB1, no córtex temporal de 12 pacientes fármaco-resistentes frente aos FAEs fenobarbital, carbamazepina, fenitoína e lamotrigina; comparamos também a expressão da PgP nesse mesmo grupo de pacientes, selecionados no Centro de Cirurgia de Epilepsia (CIREP) frente a um grupo controle composto por indivíduos não epiléticos que evoluíram para óbito examinados no Serviço de Verificação de Óbito do interior (SVOi). Utilizamos a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para determinar as concentrações dos FAEs no plasma e no cérebro, sendo que a metodologia utilizada no tecido cerebral foi desenvolvida e validada especialmente para esse fim. Essas concentrações foram então determinadas e a razão entre as duas medidas foi comparada com a expressão de PgP no tecido cerebral. Analisando os resultados concluímos que não há correlação linear entre a razão dos fármacos estudados e a expressão de PgP no córtex temporal de pacientes com epilepsia refratária.

Palavras-chave: Epilepsia, Fármaco-resistência, Glicoproteína-P

ABSTRACT

FERREIRA, F. I. S. **Evaluation of P-glycoprotein expression and its influence on antiepileptic drugs concentration in temporal cortex of patients with pharmacoresistant epilepsy.** 2015. 64f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Epilepsy, disease described for the first time in 2000 B.C., presents the convulsion or epileptic seizure as its paroxysmal event, and the International League Against Epilepsy defines the epileptic seizure as “excessive and/or hypersynchronous manifestation, usually self-limiting, from brain neurons activity”. Forty years ago the antiepileptic drugs (AEDs) emerged, but multiple resistance to AEDs is a significant problem which affects at least 30% of epileptic patients. The mechanism underlying pharmacoresistance is still unknown, but a possible cause is the inadequate accumulation of AEDs in the brain tissue related to P-glycoprotein over expression. In this context, our aim was to investigate the correlation between PgP expression, codified by ABCB1 gene, in temporal cortex of 12 pharmacoresistant patients towards AEDs phenobarbital, carbamazepine, phenytoin and lamotrigine; we also compared PgP expression between the same group of patients, selected inside Epilepsy Surgery Center (CIREP), and a control group composed by non-epileptic deceased individuals examined at the Death Verification Service from our Medicine School (SVOi). We used High Performance Liquid Chromatography to determine AEDs concentrations in plasma and brain, and the methodology applied to brain quantification was specially developed for this purpose. These two concentrations were then determined and the ratio between them was compared with PgP expression in brain tissue. Analyzing the results we concluded that there is no linear correlation between the ratio of the AEDs studied and PgP expression in temporal cortex of patients with pharmacoresistant epilepsy.

Keywords: Epilepsy, Pharmacoresistance, P-Glycoprotein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Concentrações das formas moleculares e iônicas dos fármacos antiepilépticos conforme o pH do meio. A: fenobarbital; B: fenitoína; C: carbamazepina.....	20
Figura 2: Eficiências de amplificação das sondas Taqman utilizadas para análise da expressão gênica.	27
Figura 3: Cromatogramas evidenciando a ausência de picos interferentes. A: amostra de homogenato de tecido cerebral de camundongos Swiss, utilizado para o preparo da curva de calibração. B: amostra dos reagentes utilizados no preparo das amostras sem a adição de padrões. S: pico do solvente.	31
Figura 4: Cromatogramas ilustrando a separação dos analitos. A: análise dos padrões em solução em metanol, sem adição de homogenato de tecido cerebral. B: análise dos padrões adicionados em homogenato de tecido cerebral, submetidos à técnica completa do preparo de amostras. C: carryover ou controle negativo, obtido imediatamente após a análise de amostra fortificada com alta concentração dos padrões. S: pico do solvente; LTG: lamotrigina; PB: fenobarbital; PI: padrão interno (ácido 5-etil-5-toluil barbitúrico); CBZ: carbamazepina; PHT: fenitoína.....	32
Figura 5: Gráfico ilustrativo das curvas de calibração dos fármacos antiepilépticos. PB: fenobarbital; CBZ: carbamazepina; PHT: fenitoína; LTG: lamotrigina	33
Figura 6: Expressão relativa do gene ABCB1 no grupo de estudo, aqui denominado experimental, e no grupo controle. Os genes VWF e ACTB foram utilizados como genes de referência. Média $\pm$ Desvio Padrão. Não houve diferença estatística. Teste t de Student: $p > 0,05$	41
Figura 7: Imagem representativa da reação de RT-qPCR com a amplificação do gene ABCB1 nos grupos controle (A, verde) e experimental (B, vermelho), demonstrando a similaridade de amplificação das amostras dos dois grupos (C). ...	42
Figura 8: Gráfico ilustrativo da relação entre a razão plasma:cérebro do medicamento PHT e a expressão do gene ABCB1 em relação aos genes controle. PHT: fenitoína.	44
Figura 9: Gráfico ilustrativo da relação entre a razão plasma:cérebro do medicamento CBZ e a expressão do gene ABCB1 em relação aos genes controle. CBZ: carbamazepina.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ensaios Taqman® adquiridos para as reações de qRT-PCR quantitativa para avaliação da expressão do gene ABCB1	24
Tabela 2: Parâmetros da curva de calibração e recuperação obtidos durante a validação da metodologia analítica dos fármacos antiepilépticos PB, CBZ, PHT e LTG.	34
Tabela 3: Parâmetros de precisão e exatidão obtidos durante a validação dos FAEs PB, CBZ, PHT e LTG.	35
Tabela 4: Concentração dos fármacos antiepilépticos nos fragmentos cerebrais dos pacientes estudados.	36
Tabela 5: Concentração dos fármacos antiepilépticos por massa de tecido cerebral	37
Tabela 6: Razão entre as concentrações de fármaco no plasma e no fragmento cerebral	38
Tabela 7: Regime medicamentoso dos pacientes do grupo de estudo.	39
Tabela 8: Concentração plasmática dos FAEs.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

® ou TM	Marca registrada
ABCB1	<i>ATP-binding cassette, sub-family B -1</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACTB	Beta - actina
AEDC	Ambulatório de Epilepsia de Difícil Controle
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBZ	Carbamazepina
CEUA	Comitê de ética para o uso de animais
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CIREP	Centro de Cirurgia de Epilepsia
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLB	Clobazan
CLN	Clonazepam
CV	Coeficiente de variação
DZP	Diazepam
ENP	Enalapril
EPR	Erro padrão relativo
EPS	Epilepsia Parcial Sintomática
FAE	Fármaco antiepiléptico
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCTZ	Hidroclorotiazida
ILAE	International League Against Epilepsy
IMP	Imipramina
LIQ	Limite inferior de quantificação
LTG	Lamotrigina
mRNA	RNA mensageiro
MDR1	<i>Multiple drug resistance protein 1</i>
OXC	Oxcarbazepina
PB	Fenobarbital
PgP	Glicoproteína-P
PHT	Fenitoína

qRT-PCR	Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa
RT-PCR	Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SNV	Sinvastatina
SVOi	Serviço de Verificação de Óbito do interior
TPM	Topiramato
VWF	Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Epilepsia	1
1.2 Diagnóstico de epilepsia	4
1.3 Tratamento de epilepsia	5
1.4 Fármacos antiepilépticos (FAEs).....	6
1.5 Epilepsia refratária ou fármaco-resistente.....	8
1.6 Glicoproteína-P.....	9
1.7 Visão geral sobre a epilepsia e a fármaco-resistência	12
1.8 Justificativa.....	13
2. OBJETIVOS DO TRABALHO	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	15
3.1 Caracterização do local do estudo	15
3.2 População de estudo	15
3.2.1 Critérios de inclusão.....	15
3.2.2 Procedimentos preliminares do estudo	16
3.3 Protocolo experimental para coleta de amostras.....	16
3.3.1 Grupo de estudo composto por pacientes submetidos à neurocirurgia	16
3.3.2 Grupo controle composto por indivíduos que evoluíram para óbito e submetidos à necropsia	17
3.4 Determinação da concentração dos fármacos antiepilépticos em plasma por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	17
3.4.1 Padrões e reagentes	17
3.4.2 Quantificação de fenobarbital, carbamazapina e fenitoína	19
3.4.3 Acidificação do plasma para a quantificação dos fármacos	20
3.4.4 Quantificação de lamotrigina	21
3.5 Determinação da concentração dos fármacos antiepilépticos em tecido cerebral por CLAE.....	21

3.6 Determinação da glicoproteína-p em tecido cerebral	22
3.6.1 Análise da expressão gênica	22
3.6.1.1 Preparação do cDNA	23
3.6.1.1.1 Extração de RNA	23
3.6.1.1.2 Avaliação quantitativa e qualitativa do RNA total por espectrofotometria em UV	23
3.6.1.1.3 Avaliação da integridade do RNA total.....	23
3.6.1.2 Síntese de cDNA.....	24
3.6.2 Quantificação do cDNA por qPCR	24
3.6.2.1 Escolha dos ensaios Taqman®	24
3.6.2.2 RT-PCR Quantitativa	25
3.6.2.3 Eficiências da RT-qPCR.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Características da amostra.....	28
4.2 Desenvolvimento e validação de metodologia em CLAE para quantificação simultânea de PB, CBZ, PHT e LTG em córtex temporal	29
4.3 Quantificação dos fármacos no plasma.....	39
4.4 Análise da expressão gênica	41
4.5 Relação entre a razão plasma:cérebro dos fármacos e a expressão da glicoproteína-P	43
5. CONCLUSÃO	49
6. REFERÊNCIAS.....	50
7. APÊNDICES	59
8. ANEXOS	63
8.1 Anexo I	63
8.2 Anexo II	64
8.3 Anexo III	65
8.4 Anexo IV	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

Epilepsia é um conjunto de condições clínicas caracterizadas pela recorrência de crises epiléticas. As crises epiléticas são manifestações resultantes da atividade elétrica anormal e excessiva causada por alterações estruturais e/ou funcionais dos neurônios no córtex cerebral (MOSHE et al., 1993). As manifestações clínicas consistem de fenômenos paroxísticos que podem incluir alterações da consciência, sinais ou sintomas motores, sensitivos, autonômicos e psíquicos, percebidos pela própria pessoa ou por um observador (ILAE, 1993).

Os últimos dados sobre a incidência de epilepsia são de 2008, quando HAUSER e BEGHI relataram um número aproximado de 0,05% (HAUSER e BEGHI, 2008); enquanto que a prevalência foi estimada em cerca de 1% da população mundial (HAUSER et al., 1996). No Brasil, estima-se que a prevalência seja 1,8% da população geral (BORGES et al., 2004).

As crise e síndromes epiléticas foram oficialmente classificadas pela Liga Internacional contra a Epilepsia em 1981 e 1989, respectivamente (ILAE, 1981; 1989) e apesar de frequentes tentativas de revisão dessa classificação na tentativa de modificá-la com base em novas técnicas de neuroimagem e diagnóstico, nenhuma nova classificação foi proposta definitivamente. A última mudança efetiva ocorreu em 2010 e atuou apenas nas terminologias das crises e síndromes, sem mudar a classificação etiológica das mesmas.

A classificação atual é baseada na semiologia, idade de início, evolução clínica, achados eletrencefalográficos, sinais e sintomas presentes entre as crises, mecanismos fisiopatológicos e etiológicos (SEINO, 2006):

A classificação das crises, incluindo as subclasses, é feita da seguinte maneira:

✓ Crises focais, antes denominadas crises parciais

São as crises que se originam dentro de redes limitadas a um hemisfério cerebral, ou seja, as primeiras alterações clínicas e eletroencefalográficas indicam a ativação de um grupo de neurônios localizados em um dos hemisférios cerebrais. As crises focais podem evoluir para crises convulsivas bilaterais, que é quando os dois hemisférios cerebrais foram afetados pela crise convulsiva.

Nesse tipo de crise a consciência pode ser preservada ou estar ausente, o que antes era diferenciado como crise parcial simples e crise parcial complexa, respectivamente. A nova terminologia preconiza que os termos “simples” e “complexa” sejam excluídos, mas nada impede que na descrição da crise sejam mencionados detalhes sobre como a crise evoluiu (BERG et al., 2010).

✓ Crises Generalizadas

São as crises que se iniciam em uma rede neural delimitada, mas rapidamente se espalham pelo restante do cérebro tornando-se uma crise com envolvimento bilateral.

Esse tipo de crise é dividido em seis categorias:

- Tônico-clônicas, em qualquer combinação
- Ausência
 - Típica
 - Atípica
 - Ausência com características especiais
 - Ausência mioclônica
 - Mioclonias palpebrais
- Mioclônica
 - Mioclônica
 - Mioclônica atônica
 - Mioclônica tônica
- Clônica
- Tônica
- Atônica

✓ Desconhecida, antes chamada de crises epiléticas inclassificáveis

É como se classificam as crises quando não há evidência suficiente para caracterizar como focal, generalizada ou ambas.

A etiologia da epilepsia também sofreu modificações em sua terminologia. Abaixo, estão as classificações:

✓ Genética, antes chamada de Idiopática:

São aquelas que apresentam relação com algum defeito genético que pode contribuir diretamente para a epilepsia e crises como sintoma principal do distúrbio. Ex.: canalopatias, deficiência de GLUT1.

✓ Estrutural / metabólica, antes chamadas de Sintomáticas:

São aquelas causadas por algum distúrbio estrutural/metabólico cerebral que alteram a integridade estrutural e funcional do cérebro. Ex: esclerose tuberosa.

✓ Desconhecida, antes conhecidas como Criptogênicas:

Quando a causa é desconhecida e pode ser genética, estrutural ou metabólica.

1.2 Diagnóstico de epilepsia

O diagnóstico de epilepsia é clínico, baseado principalmente na história médica, descrição das crises e exame físico. O eletroencefalograma também pode ser utilizado, mas não é pré-requisito para o diagnóstico, desde que ele pode ser normal ou com anormalidades inespecíficas (OGUNI, 2004). Exames de neuroimagem estrutural como tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética podem auxiliar no diagnóstico etiológico.

1.3 Tratamento de epilepsia

O objetivo principal do tratamento é o controle completo das crises e é primariamente centrado na administração apropriada de fármacos antiepilépticos após o diagnóstico correto (PELLOCK, 1994).

Nos últimos 30 anos muitos avanços no conhecimento do tratamento farmacológico das epilepsias têm sido realizados e vários fatores têm contribuído para isto (BRODIE, 2003). Apesar disto, ainda não entendemos completamente a epileptogênese e os mecanismos de ação de alguns fármacos antiepilépticos.

Além da escolha do antiepiléptico mais adequado, a resposta ao tratamento pode variar conforme a etiologia (SANDER, 2003). Pacientes com epilepsias idiopáticas apresentam um melhor controle de suas crises enquanto pacientes com epilepsias focais sintomáticas podem apresentar crises de difícil controle medicamentoso (FRENCH, 2007).

A história natural e o curso clínico das crises nos pacientes portadores de epilepsia dependem do tipo de síndrome epiléptica que apresentam. Em resumo o prognóstico das epilepsias pode ser assim sintetizado (SANDER, 1993):

- Excelente (20-30% dos pacientes): refere-se a síndromes epilépticas autolimitadas e benignas;
- Bom (30-40% dos pacientes): engloba síndromes epilépticas cujas crises são facilmente controladas com os FAEs. Em geral o controle das crises é permanente e, quando alcançado, permite a descontinuidade da medicação;
- Incerto (10-20% dos pacientes): inclui epilepsias cujos pacientes tendem a usar FAE por tempo indeterminado, podendo ter remissões transitórias.

- Ruim (menos de 20% dos pacientes): inclui pacientes em que o uso de FAE apenas reduz a gravidade das crises. Pacientes deste grupo podem recorrer à cirurgia de lobectomia parcial, potencialmente modificando o seu prognóstico.

Aproximadamente 70% dos pacientes portadores de epilepsia têm suas crises controladas farmacologicamente, sendo os demais 30% refratários ao tratamento clínico, apesar do uso adequado dos FAE. Estes pacientes, habitualmente classificados como fármaco-resistentes, podem ser submetidos a uma investigação detalhada que poderá definir ou excluir as possibilidades de um tratamento cirúrgico. Isto porque algumas síndromes epiléticas são consideradas cirurgicamente tratáveis, ou seja, com prognóstico melhor do que seria com o uso de novos FAEs. Dentre elas estão a epilepsia do lobo temporal secundária à esclerose hipocampal, as epilepsias focais secundárias a lesões estruturais, as epilepsias catastróficas ou epilepsias generalizadas sintomáticas em crianças secundárias a lesões confinadas a um hemisfério cerebral e as epilepsias generalizadas secundárias com crises de queda súbita (ENGEL, 1996). Em aproximadamente 30% dos pacientes submetidos a cirurgia de lobectomia a causa da epilepsia é uma lesão estrutural, tais como tumor, malformação vascular, encefalomalácia focal e malformação do desenvolvimento cortical (BROOKS et al., 1990).

1.4 Fármacos antiepiléticos (FAEs)

Os FAEs são uma das classes de medicamentos ativos no sistema nervoso central mais comumente prescritos e isso se deve ao fato de que eles podem ser usados para tratar outras condições além da epilepsia. Podemos citar topiramato e pregabalina, utilizados na prevenção de crises de enxaqueca e no controle de dor neuropática e fibromialgia, respectivamente (PERUCCA, 2005).

O bloqueio do canal de sódio voltagem dependente é o mecanismo de ação primário dos fármacos PHT, CBZ e lamotrigina (LTG), três dos quatro fármacos estudados no presente trabalho (MELDRUM, 1996). Esse mecanismo de bloqueio, dependente do uso e da voltagem do neurônio, previne seletivamente os disparos repetitivos e de alta frequência, inibindo assim a propagação do sinal epiléptico no cérebro sem comprometer funções cognitivas e psicológicas normais (PERUCCA, 2005). Apesar de não afetar as sinapses, esse bloqueio culmina na prevenção da despolarização do neurônio terminal e consequente liberação de neurotransmissores, em especial do glutamato, principal neurotransmissor excitatório. Tal propriedade torna os fármacos dessa classe indicados para o tratamento de crises parciais e tônico-clônicas com generalização secundária e possivelmente para tratar crises tônico-clônicas generalizadas (PERUCCA, 2001), mas contraindicado para tratar outros tipos de epilepsia, como por exemplo crises de ausência e crises mioclônicas, pois podem até agravar esses tipos de crise (PERUCCA, 1998).

É importante mencionar que a cinética de interação do fármaco inibidor com o canal de sódio influencia na resposta terapêutica, como podemos ver no caso da CBZ e da PHT. A afinidade da CBZ com os canais de sódio é três vezes menor que a observada com a PHT, enquanto sua velocidade de ligação ao receptor é cinco vezes maior. Tal diferença pode se traduzir em maior eficiência da CBZ no tratamento de crises nas quais a mudança de despolarização ictal é relativamente curta e melhor resposta da PHT em crises com descargas anormais caracterizadas por despolarização mais prolongada (CHUNG-CHIN et al., 1997).

Quanto à ação dos FAEs, podemos notar grande variabilidade quando consideramos qual fármaco é indicado para cada tipo de epilepsia e seu espectro de ação no tratamento da doença. Entre os fármacos estudados no presente trabalho o

PB e a LTG são os que apresentam maior espectro de ação, sendo eficazes em casos de crises parciais, com ou sem generalização secundária, e vários tipos de crises generalizadas (PERUCCA, 2001). A PHT é eficaz e indicada para casos de crises parciais, com e sem generalização secundária; crises tônico-clônicas primariamente generalizadas, ou seja, que envolvem os dois hemisférios cerebrais desde o início da crise; e estado de mal epiléptico, também chamado de estado epiléptico, que é quando uma ou várias crises ocorrem por tempo suficiente para causar danos cerebrais (ILAE, 1981). Considera-se que uma crise é potencialmente danosa quando esta ultrapassa os 30 minutos de duração ou não há recuperação neurológica ou eletro encefálica entre as crises (THEODORE, 1994). Já a indicação da CBZ é a mesma da PHT, com exceção de casos de estado epiléptico; e paralelamente ela pode ser indicada para casos de neuralgia do nervo trigêmeo e desordem bipolar (PERUCCA, 2005).

Ao mesmo tempo em que esses fármacos apresentam amplo espectro de ação, alguns podem até piorar certos tipos de crise, como ocorre com o PB, que é ineficaz em crises de ausência e pode agravar o quadro se usado nesse tipo de epilepsia; já a LTG pode piorar vários tipos de crises relacionados à epilepsia infantil mioclônica severa (GUERRINI et al., 1998; PERUCCA et al., 1998). Essa variedade de ações e efeitos adversos apenas reforça os múltiplos e complexos mecanismos de ação exercidos pelos FAEs.

1.5 Epilepsia refratária ou fármaco-resistente

Antes de 2010 podíamos dizer que não existia uma definição uniforme para epilepsia refratária (REGESTA e TANGANELLI, 1999). Era possível conceituar a fármaco-resistência em epilepsia de maneira compreensiva como a persistência de crises recorrentes apesar do uso adequado e com a dose máxima tolerada de um ou

mais fármacos antiepilépticos, utilizadas sequencialmente ou em várias combinações, excluindo-se as situações de reações alérgicas ou idiossincrásicas (PERUCCA, 1998).

Tendo em vista a falta de uma definição para a fármaco-resistência, a ILAE criou uma força tarefa para tentar chegar a um consenso sobre quando considerar um paciente epiléptico como fármaco-resistente. Após suas pesquisas, a equipe publicou em 2010 um documento com seus resultados sugerindo que um paciente pode ser considerado portador de epilepsia refratária quando este não obteve sucesso farmacoterapêutico, ou seja, ficou livre das crises, após a utilização de dois medicamentos antiepilépticos apropriados, em monoterapia ou politerapia. É importante salientar, no entanto, que essa definição só pode ser aplicada quando o paciente utilizou os medicamentos adequados, e com isso entende-se que a utilização de medicamentos não adequados para o tipo de epilepsia do paciente não deve ser contabilizada para considerar o paciente como fármaco-resistente. O uso desses medicamentos pode atrapalhar, atrasando o diagnóstico de epilepsia fármaco-resistente ou atrasando o tratamento adequado, por isso é tão importante o diagnóstico correto e tratamento dessa síndrome (KWAN et al., 2010).

Uma base genética para a refratariedade também é aventada, a qual levaria a alterações em canais iônicos e a superexpressão de algumas proteínas implicadas na fisiopatogênese da epilepsia fármaco-resistente, como as proteínas de resistência múltipla aos fármacos (SISODIYA et al., 2002; SIDDIQUI et al., 2003).

1.6 Glicoproteína-P

No endotélio dos vasos presentes na barreira hematoencefálica humana encontra-se uma glicoproteína de membrana chamada glicoproteína – P, também

conhecida como PgP (RIORDAN e LING, 1985; Ueda et al., 1986). A PgP é uma glicoproteína transmembrana do sistema de efluxo ativo, descoberta em 1976, e que faz parte de um grupo de proteínas de membrana codificadas por uma família de genes. Em seres humanos, as isoformas PgP envolvidas na resistência a múltiplos fármacos são codificadas pelo gene *multiple drug resistance protein 1* (MDR1) ou ABCB1 (LEVEILLE-WEBSTER e ARIAS, 1995). Ela foi inicialmente descoberta como um transportador de membrana envolvida na resistência à quimioterapia em vários tipos de tumores. No entanto, também é amplamente expressa em tecidos normais com funções excretórias como fígado, rins e intestino (FROMM, 2000). Além disso, exerce funções de barreira, como na barreira hemato-encefálica (SARKADI et al., 1996). Acredita-se assim, que a PgP possua uma função fisiológica nos tecidos normais relativas à excreção e/ou proteção desses tecidos contra toxinas que ocorrem naturalmente ou contra xenobióticos, incluindo fármacos (JETTÉ et al., 1995). Foi descoberto em modelos de fármaco-resistência *in vitro* que ela exporta moléculas planares e hidrofóbicas das células conferindo resistência a citotoxinas (RIORDAN e LING, 1985; UEDA et al., 1986; HORIO et al., 1988; MORROW e COWAN, 1988).

Altos níveis de expressão do gene MDR1 foram encontrados em alguns tipos de tumores irresponsíveis ao tratamento quimioterápico. Resultado semelhante foi encontrado por Matsumoto e colaboradores em 1991, quando o grupo encontrou alto nível de MDR1 em astrocitomas, enquanto em astrócitos normais esse aumento não estava presente (CORDON-CARDO et al., 1989; MATSUMOTO et al., 1991).

Em 1995, TISHLER et al. relataram aumento da expressão do gene ABCB1 e a proteína por ele decodificada em pacientes com epilepsia refratária. Surgiu então a teoria de que essa glicoproteína seria a responsável pela diminuição dos efeitos dos FAEs (KWAN e BRODIE, 2005). Níveis de RNA mensageiro (mRNA) do gene MDR1

foram determinados por *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR), ou seja, uma reação de transcriptase reversa, seguida de uma reação em cadeia da polimerase em amostras do cérebro removido de pacientes durante a cirurgia de ressecção de epilepsia de difícil controle e comparados com espécimes controle normal do cérebro obtidos de pacientes submetidos à remoção de malformações arteriovenosas. Neste contexto, foi proposto que a PgP pode desempenhar um papel clinicamente significativo, por limitar a entrada de FAEs no parênquima cerebral e, deste modo o aumento da expressão de MDR1 pode contribuir para a refratariedade das crises em pacientes com epilepsia fármaco-resistente.

Esta teoria vem sendo avaliada desde então, porém até o momento não existe um consenso sobre a real importância desta glicoproteína na fármaco-resistência desses pacientes. Estudos mais aprofundados e diferenciados ainda são necessários para avaliar o mecanismo exato dessa hipótese (LÖSCHER e DELANTY, 2009).

SYVÄNEN et al., um dos grupos a seguir essa linha de estudos, utilizaram dois grupos de ratos com epilepsia induzida, sendo um tratado com tariquidar, um inibidor da PgP, e o outro grupo controle tratado com salina. O experimento visava a distribuição de (R)-[¹¹C]verapamil no cérebro e o resultado encontrado foi uma maior concentração do metabólito do verapamil no grupo tratado, mostrando que a PgP influencia na passagem de fármacos do plasma para o tecido cerebral (SYVÄNEN et al., 2011).

Supondo-se que a PgP esteja realmente envolvida da fármaco-resistência, é necessário elucidar qual o gatilho ou mecanismo por trás da superexpressão dessa glicoproteína. Então, na tentativa de correlacionar os polimorfismos C1236T, G2677T/A, e C3435T no gene ABCB1 com a ocorrência de epilepsia fármaco-resistente, um estudo foi realizado em crianças chinesas e uma mutação no gene

ABCB1 foi reportada. No entanto, os resultados deste estudo não mostraram a associação entre essa mutação e a fármaco-resistência (DONG et al., 2011). Por outro lado, BASIC et al. mostraram correlação entre o polimorfismo C3435T do ABCB1 e a penetração de PB através da barreira hematoencefálica, sugerindo que essa mutação poderia estar envolvida na fármaco-resistência (BASIC et al., 2008).

1.7 Visão geral sobre a epilepsia e a fármaco-resistência

A epilepsia tem seus primeiros relatos em documentos médicos antigos de povos egípcios e babilônios (MASIA e DEVINSKY, 2000), o que nos permite estimar que sua primeira identificação tenha ocorrido aproximadamente no ano 2000 a.C.

A International League Against Epilepsy (ILAE) define a crise epiléptica como “manifestação excessiva e/ou hipsíncronica, normalmente autolimitada, da atividade dos neurônios no cérebro” (ILAE, 1981). Há 40 anos surgiram os medicamentos antiepilépticos carbamazepina (CBZ) e ácido valpróico, trazendo mais opções de tratamento farmacológico além do fenobarbital (PB) e da fenitoína (PHT); porém, apesar das mudanças de regime de dosagem e das modernas alternativas desenvolvidas desde então no campo dos medicamentos, entre 20 e 40% dos pacientes acometidos com essa doença devastadora apresentam resistência múltipla a fármacos antiepilépticos (FAEs), condição conhecida como epilepsia refratária ou simplesmente epilepsia fármaco-resistente (SCHMIDT e LÖSCHER, 2005).

Nas últimas décadas houve um grande avanço no tratamento dessa doença além de novas terapias, como estimulação vagal e o tratamento cirúrgico. Muitos FAEs, incluindo PHT, PB e CBZ tem estruturas químicas parecidas com os substratos da proteína de membrana glicoproteína-P (PgP), que funciona como bomba de efluxo para xenobióticos (JETTÉ et al., 1995), o que poderia acarretar em baixa eficiência do

tratamento medicamentoso. Apesar das teorias desenvolvidas, o mecanismo exato da fármaco-resistência desenvolvida em pacientes epiléticos ainda é desconhecido, porém uma possível causa seria a inadequada acumulação intraparenquimal do fármaco antiepilético causada pela expressão aumentada da PgP (KWAN e BRODIE, 2005; SCHMIDT e LÖSCHER, 2005).

1.8 Justificativa

O presente trabalho foi planejado com o propósito de investigar o comportamento dos FAEs em pacientes fármaco-resistentes relacionando a expressão do gene ABCB1, precursor da PgP, com a relação plasma:cérebro dos FAEs. Ao mesmo tempo, comparou-se a expressão do gene ABCB1 em dois grupos de indivíduos, sendo o primeiro composto por pacientes portadores de epilepsia refratária e o segundo por indivíduos que evoluíram para óbito e não portadores de epilepsia.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

2.1 Objetivo geral

Correlacionar a expressão da PgP, codificada pelo gene ABCB1, no córtex temporal com a razão plasma:cérebro dos FAEs de pacientes com epilepsia refratária.

2.2 Objetivos específicos

Quantificar a expressão do mRNA referente ao gene ABCB1 presente no córtex temporal obtido através de metodologia de RT-PCR em tempo real, também chamada de quantitativa (qRT-PCR).

Quantificar os medicamentos antiepilépticos utilizados pelos pacientes, sendo eles PHT, PB, CBZ e LTG no plasma e córtex temporal, em amostras coletadas ao mesmo tempo durante a cirurgia, para estabelecimento da razão plasma:cérebro dos FAEs.

Correlacionar os dados e realizar as análises estatísticas.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Caracterização do local do estudo

O presente trabalho foi realizado através de colaboração interdisciplinar entre a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), o Centro de Cirurgia de Epilepsia (CIREP) do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento, o Departamento de Cirurgia e Anatomia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) e o Serviço de Verificação de Óbitos do interior (SVOi), todos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Para tanto, temos a aprovação do CEP/FCFRP nº 225/2011 e carta de concordância do CEP – HCRP.

3.2 População de estudo

3.2.1 Critérios de inclusão

Os pacientes foram recrutados no Centro de Cirurgia de Epilepsia (CIREP) do HCFMRP-USP, seguindo os seguintes critérios:

- Pacientes acima de 18 anos;
- Pacientes com epilepsia fármaco-resistente, submetidos à avaliação cirúrgica de epilepsia secundária à esclerose hipocampal (grupo de estudo);
- Indivíduos sem diagnóstico de epilepsia e que evoluíram para óbito por motivos naturais, exceto tumores cerebrais malignos de qualquer grau ou metástase cerebral proveniente de qualquer outro tumor maligno (grupo controle);

3.2.2 Procedimentos preliminares do estudo

Pacientes provenientes do Ambulatório de Epilepsia de Difícil Controle (AEDC) do HCFMRP – USP foram incluídos no estudo através do CIREP à medida que eram selecionados para a cirurgia de lobectomia para o tratamento de epilepsia refratária. A seleção para a cirurgia dava-se quando o controle das crises epiléticas não era alcançado após o tratamento do paciente no AEDC. Após a investigação clínica ser realizada e avaliar se a cirurgia era benéfica para o paciente, reuniões clínicas, exames de vídeo EEG e avaliações multidisciplinares envolvendo psiquiatras, enfermeiros, neuropsicólogos e assistente social eram realizadas para subsidiar a avaliação clínica. O paciente era convidado a participar do estudo na sua internação no dia anterior ao da cirurgia.

Em relação ao grupo controle era necessário avaliar a entrada de cadáveres no SVOi diariamente e analisar o histórico disponível dos corpos a serem necropsiados. A família era contatada e solicitávamos a autorização para a coleta quando o cadáver se encaixava nos critérios de inclusão do grupo controle.

3.3 Protocolo experimental para coleta de amostras

3.3.1 Grupo de estudo composto por pacientes submetidos à neurocirurgia

Durante as cirurgias, realizadas pelo Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr., Prof. Dr. João Alberto Assirati Jr. e os residentes da Neurocirurgia, o tecido cerebral foi ressecado e um fragmento do córtex cerebral da peça extraída foi recolhido e separado em três ou quatro partes que foram congeladas em nitrogênio líquido imediatamente para a conservação do mRNA, utilizado na análise da expressão de

PgP. No laboratório as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento da análise.

O sangue foi coletado à vácuo em tubos de 4,0mL contendo heparina de lítio ao mesmo tempo em que era realizada a extração do córtex cerebral, centrifugado e o plasma armazenado a -20°C.

O tecido cerebral e o sangue foram utilizados na determinação da concentração de PB, PHT, CBZ e LTG de acordo com a medicação prescrita para cada paciente. Já a dosagem da PgP e a quantificação do mRNA foram realizadas no tecido cerebral.

3.3.2 Grupo controle composto por indivíduos que evoluíram para óbito e submetidos à necropsia

As amostras do grupo controle foram colhidas durante a necropsia, logo após a finalização do exame realizado pelo médico legista. O fragmento do córtex temporal foi colhido e congelado imediatamente para preservação do mRNA a ser utilizado da análise de PgP.

Os procedimentos adotados para o armazenamento e análise foram os mesmos utilizados com as amostras de pacientes.

3.4 Determinação da concentração dos fármacos antiepilépticos em plasma por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

3.4.1 Padrões e reagentes

Os padrões de PB, CBZ, PHT, LTG e ácido 5-etil-5-toluil barbitúrico foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich® (Saint Louis, MO, Estados Unidos da América).

Os reagentes acetato de sódio, ácido acético glacial, metanol, acetonitrila, diclorometano e isopropanol utilizados para as análises dos fármacos foram adquiridos da empresa Merck® (Darmstadt, Alemanha).

Para as análises da concentração plasmática dos FAEs fizemos uma solução com os três fármacos, PB, CBZ e PHT. Para isso, os três padrões foram pesados e diluídos juntos em metanol, resultando em uma solução estoque com as seguintes concentrações de 0,8 mg de PB/mL de metanol, 0,32 mg de CBZ/mL de metanol e 0,8 mg de PHT/mL de metanol. A partir dessa solução estoque fizemos várias diluições que resultaram em soluções padrão, e ao adicionar 25µL dessas soluções a 500µL de plasma obtivemos as concentrações finais de 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0 e 40,0µg de PB/mL de plasma, 1,6; 3,2; 4,8; 6,4; 8,0 e 16,0µg de CBZ/mL de plasma e 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0 e 40,0µg de PHT/mL de plasma. A LTG foi preparada separadamente do PB, PHT e LTG. A solução estoque de LTG apresentava a concentração de 1,0mg/mL de metanol e após as diluições para construção da curva de calibração com 25µL de cada ponto em 500µL de plasma, obtivemos as concentrações de 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0µg de LTG/mL de plasma.

Para as análises da concentração dos FAEs em tecido cerebral fizemos uma solução com os quatro fármacos, PB, CBZ, PHT e LTG. Para isso, os quatro padrões foram pesados e diluídos juntos em metanol, resultando em uma solução estoque com as seguintes concentrações de 1,0 mg de PB/mL de metanol, 0,32 mg de CBZ/mL de metanol, 0,8 mg de PHT/mL de metanol e 0,8 mg de LTG/mL de metanol. A partir dessa solução estoque fizemos várias diluições que resultaram em soluções padrão, e ao adicionar 25µL dessas soluções a 500µL de homogenato de tecido cerebral obtivemos as concentrações finais de 0,4; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 15,0µg PB/mL de homogenato, 0,25; 0,32; 0,64; 0,96; 1,28; 1,60; 2,4 e 9,6µg de CBZ/mL de

homogenato, 0,6; 0,8; 1,6; 2,4; 3,2; 4,0; 6,0 e 24,0µg de PHT/mL de homogenato e 0,12; 0,24; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 e 4,5µg de LTG/mL de homogenato.

3.4.2 Quantificação de fenobarbital, carbamazapina e fenitoína

A quantificação dos FAEs em plasma foi realizada no laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP através de metodologia desenvolvida e validada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e amplamente utilizada no laboratório para os exames de rotina.

Para a preparação da amostra adicionamos 25µL de ácido 5-etil-5-toluil barbitúrico aplicado como padrão interno, 25µL de HCl 1M e 5mL de diclorometano a 500µL de plasma do paciente. Após a agitação em mixer por um minuto e centrifugação por 5 minutos, a fase orgânica foi recolhida. Após a concentração da fase orgânica sob fluxo de ar, o resíduo foi ressuspendido em 200µL de fase móvel e submetido a 100µL de n-hexano, e a fase móvel injetada no CLAE.

O cromatógrafo líquido utilizado nas análises era composto por uma bomba modelo C-10AT ajustado para vazão de 1,0 mL/min, detector de UV/VIS modelo SPD-10A ajustado no comprimento de onda de 220 nm e auxiliar range 2 e integrador modelo C-R8A, todos da marca Shimadzu® (Japão). A coluna utilizada foi a LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5µm) equipada com pré-coluna RP-8 (5µm), ambas da Merck® (Darmstadt, Alemanha).

Para a análise de CBZ, PB e PHT a fase móvel utilizada foi 68% de tampão acetato de sódio 0,25M pH 4,4, 30% de fase orgânica composta por acetonitrila e metanol na proporção 11:1 (v:v) e 2% de isopropanol.

3.4.3 Acidificação do plasma para a quantificação dos fármacos

A acidificação das matrizes biológicas foi um passo muito importante para o processo de extração, pois o PB e a PHT são ácidos fracos e devem estar em sua forma molecular, ou seja, sem carga, para que possam ser transferidos para o solvente extrator, o diclorometano. O mesmo não ocorre com a CBZ, porém a acidificação da matriz não interfere no processamento desse fármaco (Figura 1).

Figura 1: Concentrações das formas moleculares e iônicas dos fármacos antiepilépticos conforme o pH do meio. A: fenobarbital; B: fenitoína; C: carbamazepina. Eixo x = pH; eixo y = concentração. Fonte: www.chemicalize.org

3.4.4 Quantificação de lamotrigina

Para a preparação da amostra utilizada na quantificação de LTG adicionamos 25µL ácido 5-etil-5-toluil barbitúrico como padrão interno e 500 µL de acetonitrila a 500µL de plasma do paciente e após agitação em mixer por um minuto e centrifugação por 5 minutos, 200µL do sobrenadante foram concentrados sob fluxo de ar em tubo cônico. O resíduo restante foi ressuspenso em 200µL de fase móvel e 100µL de n-hexano. Após centrifugação a fase móvel foi injetada no CLAE.

O cromatógrafo líquido utilizado nas análises era composto por uma bomba modelo C-10AT ajustado para vazão de 1,0 mL/min, detector de UV/VIS modelo SPD-10A ajustado no comprimento de onda de 220 nm e auxiliar range 2 e integrador modelo C-R8A, todos da marca Shimadzu® (Japão). A coluna utilizada foi a LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5µm) equipada com pré-coluna RP-8 (5µm), Merck® (Darmstadt, Alemanha).

Para a análise de LTG a fase móvel foi constituída de 78% de tampão acetato 0,25M pH 4,4 e 22% de fase orgânica composta por acetonitrila e metanol na proporção 11:1 (v:v).

3.5 Determinação da concentração dos fármacos antiepilépticos em tecido cerebral por CLAE

As quantificações de PB, CBZ, PHT e LTG foram realizadas no tecido cerebral em um único procedimento. Para tanto, foram necessários alguns ajustes no procedimento anterior, além da validação dessa nova metodologia.

Para a quantificação simultânea dos quatro antiepilépticos no tecido cerebral homogeneizamos certa quantidade do fragmento de córtex temporal em 500 µL de água Milli-Q utilizando um homogeneizador de tecidos do tipo Potter-Elvehjem na

velocidade de 700 rpm em 3 ciclos de 15 segundos cada com intervalo de 15 segundos e adicionamos ao homogenato obtido 50µL de ácido 5-etil-5-toluil barbitúrico como padrão interno. Após a quantificação, a concentração de fármaco foi corrigida pela massa do fragmento utilizado neste passo.

Promovemos a desproteinização do homogenato adicionando 1 mL de acetonitrila à mistura, a qual agitamos em mixer por um minuto e centrifugamos por três minutos a 1800 rpm. Coletamos 500 µL do sobrenadante, levamos à secagem sob fluxo de ar, ressuspendemos em 60 µL de fase móvel e 20 µL de n-hexano, centrifugamos e injetamos 20 µL da fase móvel no CLAE.

A fase móvel utilizada nessa etapa foi composta por 78% de tampão acetato 0,25M pH 4,4 e 22% de fase orgânica, acetonitrila e metanol na proporção 11:1 (v:v). Utilizamos a coluna LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5 µm) equipada com pré-coluna LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5 µm), ambas da fabricante Merck® (Darmstadt, Alemanha), e cromatógrafo líquido composto por uma bomba modelo LC-10AT ajustado para a vazão de 1,3 mL/min, detector de UV/VIS modelo SPD-10A ajustado no comprimento de onda de 220 nm, auxiliar range 1 e integrador modelo C-R8A, todos da marca Shimadzu® (Japão).

Utilizamos cérebros de camundongos Swiss (protocolo CEUA 10.1.1052.53.9, anexo) para todo o processo de desenvolvimento e validação da metodologia analítica de determinação do tecido cerebral por CLAE.

3.6 Determinação da glicoproteína-p em tecido cerebral

3.6.1 Análise da expressão gênica

A expressão gênica foi avaliada por meio da quantificação do mRNA do gene ABCB1 com a técnica de qRT-PCR.

3.6.1.1 Preparação do cDNA

3.6.1.1.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído do fragmento de córtex temporal dos pacientes epiléticos pelo kit *PureLink™ RNA Mini Kit* (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos da América), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.6.1.1.2 Avaliação quantitativa e qualitativa do RNA total por espectrofotometria em UV

A avaliação da quantidade e qualidade do RNA total extraído foi feita com o espectrofotômetro NanoDrop 200c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). A pureza das amostras foi verificada pelas razões A_{260}/A_{280} , que mostra possíveis contaminações por proteínas e DNA; e pela razão A_{260}/A_{230} que mostra contaminação por sais e compostos orgânicos, como guanidina ou fenol. Amostras de RNA total com grau de pureza aceitável apresentam razões A_{260}/A_{230} entre 1,7 e 2,2 e A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0.

3.6.1.1.3 Avaliação da integridade do RNA total

A integridade do RNA total foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. A agarose foi fundida em 50 mL de tampão TAE (Tris-acetato 40mM e EDTA 1mM pH 8,0) e à mistura foram adicionados 5 μ L de corante GelRed (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil). Cada amostra aplicada no gel foi preparada com 1 μ g de RNA total e 20% v/v de tampão de aplicação 6X (30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol). Os géis contendo as amostras foram submetidos à eletroforese no mesmo tampão TAE por 90 minutos a 80V e em seguida

foram visualizados e fotografados em foto-documentador UV (Molecular Imager® Gel Doc™ XR, Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos da América).

3.6.1.2 Síntese de cDNA

Para a construção do cDNA foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos da América), de acordo com o protocolo do fabricante. Imediatamente antes desse processo, todas as amostras foram tratadas com o kit *Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos da América) para a eliminação de qualquer DNA genômico.

3.6.2 Quantificação do cDNA por qPCR

3.6.2.1 Escolha dos ensaios Taqman®

Os ensaios Taqman® foram adquiridos da empresa Life Technologies (Carlsbad, CA, Estados Unidos da América) e estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Ensaios Taqman® adquiridos para as reações de qRT-PCR quantitativa para avaliação da expressão do gene ABCB1

Gene (símbolo)	Gene (nome completo)	Ensaio Taqman® ID
<i>ABCB1</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	Hs00184500_m1
<i>VWF</i> *	von Willebrand fator	Hs01109446_m1
<i>ACTB</i> *	actin, beta	Hs01060665_g1

*Genes de referência

3.6.2.2 RT-PCR Quantitativa

A expressão do gene *ABCB1* foi avaliada por ensaio de RT-qPCR comparando-se os níveis de expressão entre o grupo de estudo e o grupo controle. As reações foram realizadas utilizando o termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, Estados Unidos da América), kit *TaqMan® Universal Master Mix II* (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos da América), placas contendo 96 poços (Life Technologies) e seguiram as seguintes condições: volume final de 20 µL/poço, sendo 10 µL de *TaqMan® Universal Master Mix II*, 9,5 µL de amostra diluída de cDNA (5 ng/µL) e 0,5 µL do ensaio *TaqMan®* do gene de estudo.

O aparelho utilizado nessa etapa foi gentilmente cedido pela Profª Drª Maria de Lourdes Pires Bianchi e adquirido com verba FINEP 01.09.0447.00 - CT - INFRA 2008.

As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de a 50°C por 2 minutos, seguido por um ciclo a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos constituídos de: desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Todas as reações foram realizadas com 3 replicatas técnicas. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proposto por PFAFFL (2001), utilizando os genes *actin*, *beta* (*ACTB*) e *von Willebrand factor* (*VWF*) como genes de referência. Para a normalização dos resultados com os genes de referência foram utilizadas as médias geométricas dos *cycle threshold* (CT) de cada amostra dos dois genes de referência, conforme proposto por VANDESOMPELE et al. (2002).

3.6.2.3 Eficiências da RT-qPCR

Um dos parâmetros mais críticos utilizados para garantir a qualidade dos resultados obtidos com a RT-qPCR é a curva de regressão linear derivada dos valores de CT de diluições seriadas dos padrões de calibração. Idealmente, o valor do *slope*

deve ser -3,32, o que garante uma eficiência de 100% na qPCR. Porém, valores de *slope* entre 3,10 a 3,59 correspondem a uma variação entre 90 e 110% e são perfeitamente aceitáveis (NOLAN et al., 2006).

Antes das análises de expressão, todos os genes foram analisados quanto à eficiência de amplificação. Para isso, uma curva de diluição 2:1, com 5 pontos, com uma quantidade inicial de 50ng de RNA total foi preparada. A Figura 2 mostra que todas as amplificações apresentaram uma eficiência entre 90 e 110%, consideradas ideais para a aplicação do método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$ proposto por PFAFFL (2001).

Figura 2: Eficiências de amplificação das sondas Taqman utilizadas para análise da expressão gênica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características da amostra

O grupo de estudo foi composto por 12 pacientes recrutados no CIREP entre junho de 2012 e setembro de 2012 e o grupo controle por dez indivíduos oriundos do SVOi no período de março de 2014 a julho de 2014.

O grupo de estudo foi composto por oito homens e quatro mulheres, com idade média de $40 \pm 14,78$ anos (faixa de 20 a 59 anos), com cinco apresentando comorbidades: dois com transtornos psiquiátricos; dois casos de hipertensão arterial sistêmica, sendo um associado a *diabetes mellitus* e outro a dislipidemia e hepatite B crônica; e um caso de câncer de mama em remissão desde 2001. Não encontramos na literatura nenhuma evidência de que essas comorbidades poderiam afetar os resultados da expressão da PgP estudada em nosso trabalho.

No grupo controle os indivíduos que evoluíram para óbito por causas naturais, não violentas, sendo sete homens e três mulheres, com idade média de $70 \pm 12,04$ anos, variando entre 50 e 83. A maior média de idade constatada neste grupo é típica nos indivíduos encaminhados ao SVOi e indivíduos submetidos a necropsia com morte natural domiciliar, com doenças crônicas controladas, sem necessidade de internação na época do falecimento. As principais causas de morte foram: idade avançada, infarto e pneumonia. Casos de infarto agudo do miocárdio, choque hipovolêmico com desbalanço eletrolítico e edema pulmonar agudo foram constatados. Nos outros indivíduos a causa da morte foi pneumonia bilateral com sepse, sepse e pielonefrite, cardiopatia hipertensiva, insuficiência cardíaca e pneumonia bilateral. Não encontramos na literatura nenhuma evidência de que a idade influenciaria na expressão ou quantidade de PgP em indivíduos saudáveis ou epiléticos.

Como mencionado nos critérios de inclusão, item 3.2.1, os pacientes alocados no grupo de estudo eram portadores de epilepsia secundária à esclerose hipocampal, um tipo de epilepsia parcial sintomática (EPS). Escolhemos esses pacientes justamente porque nesse tipo de epilepsia, a cirurgia é indicada como recurso terapêutico e o número de pacientes com EPS e fármaco-resistentes é elevado, dado demonstrado em um estudo de longa duração apresentado por SCHMIDT E LÖSCHER (2005), no qual 49% dos pacientes com epilepsia parcial sintomática eram refratários ao tratamento. Nesse estudo, apenas o grupo portador de epilepsia sintomática generalizada apresentou maior porcentagem de pacientes refratários em relação aos pacientes com EPS não responsivos ao tratamento (SCHMIDT e LÖSCHER, 2005).

4.2 Desenvolvimento e validação de metodologia em CLAE para quantificação simultânea de PB, CBZ, PHT e LTG em córtex temporal

Para uma metodologia simples, rápida e simultânea a quantificação dos FAEs no córtex temporal foi desenvolvida por CLAE, a partir dos métodos de análise aplicados ao plasma citados nos itens 3.4.2 e 3.4.4, já utilizados na rotina do laboratório de Análises Toxicológicas da FCFRP. A primeira tentativa consistiu em analisar os quatro FAEs através de extração líquido-líquido com diclorometano conforme descrito no item 3.4.2, mas a recuperação da LTG foi insatisfatória. O teste seguinte foi executado a partir do método empregado na quantificação de LTG em plasma, pois este emprega a desproteinização com acetonitrila durante o preparo de amostra. Tal preparo se mostrou compatível também com o PB, o PHT e a CBZ pois os valores de recuperação destes analitos após o método escolhido foram adequados, sendo 100, 98, 93 e 75% para PB, CBZ, PHT e LTG, respectivamente.

Considerando a escassez de cérebro humano, utilizamos homogenato de cérebros de camundongos Swiss durante o desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação simultânea de FAEs em tecido cerebral. Os cérebros dos animais foram gentilmente cedidos pela aluna Daniela Spuri Bernardi após o uso dos camundongos nos experimentos de sua tese de doutorado. Analisamos o homogenato e esse não apresentou interferentes, permitindo assim seu uso como matriz em nosso estudo, conforme mostrado na Figura 3 a seguir.

Figura 3: Cromatogramas evidenciando a ausência de picos interferentes. A: amostra de homogenato de tecido cerebral de camundongos Swiss, utilizado para o preparo da curva de calibração. B: amostra dos reagentes utilizados no preparo das amostras sem a adição de padrões. S: pico do solvente.

Durante o desenvolvimento da metodologia, verificamos que a maioria dos parâmetros utilizados no método já validado para plasma poderiam ser mantidos, exceto a vazão da fase móvel, ajustada para 1,3 mL/min, o que conferiu melhor separação dos analitos, conforme resultado apresentado na Figura 4.

Figura 4: Cromatogramas ilustrando a separação dos analitos. A: análise dos padrões em solução em metanol, sem adição de homogenato de tecido cerebral. B: análise dos padrões adicionados em homogenato de tecido cerebral, submetidos à técnica completa do preparo de amostras. C: carryover ou controle negativo, obtido imediatamente após a análise de amostra fortificada com alta concentração dos padrões. S: pico do solvente; LTG: lamotrigina; PB: fenobarbital; PI: padrão interno (ácido 5-etil-5-toluil barbitúrico); CBZ: carbamazepina; PHT: fenitoína.

O intervalo de concentração dos FAEs utilizados na curva de calibração do tecido cerebral foi estipulado através de um estudo piloto, no qual a determinação das concentrações dos FAEs no homogenato cerebral foi realizada em um grupo de pacientes com epilepsia refratária.

As novas concentrações e intervalos da curva de calibração definidas a partir destes testes foram:

- De 0,4 a 15,0 µg/mL de homogenato para PB,
- De 0,25 a 9,6 µg/mL de homogenato para CBZ,
- De 0,6 a 24 µg/mL de homogenato para PHT,
- De 0,12 a 4,5 µg/mL de homogenato para LTG.

A Figura 5 apresenta as curvas de calibração obtidas, suas equações de reta e R^2 .

Figura 5: Gráfico ilustrativo das curvas de calibração dos fármacos antiepiléticos. PB: fenobarbital; CBZ: carbamazepina; PHT: fenitoína; LTG: lamotrigina

Estabelecemos o Limite Inferior de Quantificação (LIQ) para os FAEs e obtivemos os valores de 0,4 µg/mL para PB, 0,256 µg/mL para CBZ, 0,6 µg/mL para PHT e 0,12 µg/mL para LTG.

A Tabela 2 resume os parâmetros obtidos para as curvas de calibração durante o processo de validação.

Tabela 2: Parâmetros da curva de calibração e recuperação obtidos durante a validação da metodologia analítica dos fármacos antiepilépticos PB, CBZ, PHT e LTG.

FAE	Recuperação	LIQ	Faixa de Concentração	Equação da Reta	R ²
PB	100%	0,4 µg/mL	0,4 - 15 µg/mL	y=0,415x-0,1942	0,9966
CBZ	98%	0,256 µg/mL	0,25 - 9,6 µg/mL	y=0,8646x-0,0516	0,9985
PHT	93%	0,6 µg/mL	0,6 - 24 µg/mL	y=0,1377x+0,0191	0,9994
LTG	75%	0,12 µg/mL	0,12 - 4,5 µg/mL	y=1,9388x-0,4929	0,9934

FAE: fármaco antiepiléptico; LIQ: Limite Inferior de Quantificação; PB: fenobarbital; CBZ: carbamazepina; LTG: lamotrigina; PHT: fenitoína.

Calculamos os parâmetros precisão e exatidão utilizando quatro diferentes corridas analíticas, executadas em dias seguidos. As fórmulas utilizadas para o cálculo dos valores de Coeficiente de Variação (CV) para precisão e Erro Padrão Relativo (EPR) para exatidão estão destacadas abaixo (ANVISA, 2012).

$$CV = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração experimental}} \times 100$$

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal})}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

Os valores obtidos para precisão e exatidão, intracorrída e intercorridas, estão agrupados na Tabela 3 e apresentados em três concentrações (baixa, média e alta), a seguir.

Tabela 3: Parâmetros de precisão e exatidão obtidos durante a validação dos FAEs PB, CBZ, PHT e LTG.

		Precisão (CV %)				Exatidão (EPR %)			
		LTG	PB	CBZ	PHT	LTG	PB	CBZ	PHT
Dia 1	CQB	8,39	6,07	3,11	5,81	3,26	5,32	7,31	0,88
Intracorrída	CQM	4,82	4,87	5,38	5,89	5,33	2,31	1,45	0,80
n=5	CQA	5,90	6,86	6,94	6,82	9,09	2,85	6,47	4,86
Dia 2	CQB	14,22	8,27	5,20	9,74	10,56	-0,98	-3,10	4,44
Intracorrída	CQM	1,42	3,48	4,60	4,09	-0,34	-3,44	-4,90	-1,13
n=5	CQA	1,68	2,78	2,58	2,49	4,11	4,11	-3,72	-2,11
Dia 3	CQB	11,92	6,11	10,39	8,30	7,34	-4,74	-9,40	-3,60
Intracorrída	CQM	11,43	11,78	13,14	12,76	12,99	4,95	2,95	1,65
n=5	CQA	12,41	3,58	3,37	3,76	2,33	-6,20	-5,76	-8,17
Dia 4	CQB	7,07	7,60	2,705	1,99	0,67	-0,56	-0,97	-13,79
Intracorrída	CQM	4,78	2,95	2,32	3,76	-0,48	-1,73	-0,90	0,05
n=5	CQA	4,43	3,02	3,50	3,32	0,95	-2,73	-1,19	1,37
Intercorrídas n=20	CQB	12,58	6,92	6,38	10,77	7,96	-2,90	-4,40	-4,22
	CQM	9,43	7,29	7,89	7,23	5,27	-0,63	-1,89	-0,65
	CQA	9,61	5,58	5,15	13,90	6,62	-2,88	-2,15	-4,98

CV: coeficiente de variação; EPR: erro padrão relativo; CQB: amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQM: amostra de controle de qualidade de média concentração; CQA: amostra de controle de qualidade de alta concentração; LTG: lamotrigina; PB: fenobarbital; CBZ: carbamazepina; PHT: fenitoína.

Os valores obtidos nessa fase da validação não ultrapassaram a faixa permitida de $\pm 15\%$ do valor nominal estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012). Conclui-se então que nosso método analítico é adequado pois está de acordo com os limites de confiança estabelecidos pela ANVISA.

A Tabela 4 abaixo relaciona os valores dos FAEs obtidos a partir da quantificação no fragmento cerebral. O resultado está expresso em massa (microgramas) por volume (mililitro) de homogenato.

Tabela 4: Concentração dos fármacos antiepilépticos nos fragmentos cerebrais dos pacientes estudados.

Paciente	PB (µg/mL homogenato)	CBZ (µg/mL homogenato)	LTG (µg/mL homogenato)	PHT (µg/mL homogenato)	Concentração do fragmento cerebral (mg/ml de água)
1	-	4,14	-	1,43	236
2	-	2,19	-	1,62	144
3	-	2,50	-	1,64	174
4	-	3,46	-	2,48	198
5	ND	-	-	2,28	150
6	-	1,95	-	1,96	126
7	-	-	0,30	4,64	194
8	-	1,97	-	1,84	216
9	-	-	-	0,31	78
10	-	1,61	0,72	ND	166
11	2,47	-	1,62	2,59	264
12	-	1,16	0,32	ND	90

PB: fenobarbital; CBZ: carbamazepina; LTG: lamotrigina; PHT: fenitoína. “-” = o paciente não utilizava esse fármaco. ND = O paciente utilizava o fármaco, mas ele não foi detectado na análise. A concentração do fragmento cerebral diz respeito à massa de tecido homogeneizado em água a fim de obtermos o homogenato. Após análise, a concentração de fármaco por grama de tecido é obtida a partir da correção do valor nas colunas PB, CBZ, PHT e LTG pela concentração de homogenato.

A Tabela 5 demonstra a quantidade de fármaco existente em cada miligrama de tecido cerebral.

Tabela 5: Concentração dos fármacos antiepilépticos por massa de tecido cerebral

Paciente	Concentração do fragmento cerebral (mg/ml de água)	PHT ($\mu\text{g/mL}$ homogenato)	Massa de PHT x massa de tecido (mg/mg)	CBZ ($\mu\text{g/mL}$ homogenato)	Massa de CBZ x massa de tecido (mg/mg)
1	236	1,43	0,00605	4,14	0,01754
2	144	1,62	0,01125	2,19	0,01520
3	174	1,64	0,00942	2,50	0,01436
4	198	2,48	0,01252	3,46	0,01747
5	150	2,28	0,0152	ND	ND
6	126	1,96	0,01555	1,95	0,01547
7	194	4,64	0,02391	ND	ND
8	216	1,84	0,00851	1,97	0,00912
9	78	0,31	0,00397	ND	ND
10	166	ND	ND	1,61	0,00969
11	264	2,59	0,00981	ND	ND
12	90	ND	ND	1,16	0,01288

CBZ: carbamazepina; PHT: fenitoína. ND = Não disponível.

Para o cálculo das quantidades de fármaco por miligrama de tecido cerebral não utilizamos a LTG ou o PB porque poucos pacientes incluídos no estudo usavam esses medicamentos.

Na Tabela 6 estão apresentadas as razões entre as quantidades de fármaco no plasma e no cérebro.

Tabela 6: Razão entre as concentrações de fármaco no plasma e no fragmento cerebral

Paciente	Massa de PHT x massa de tecido (mg/mg)	Concentração de PHT no plasma (µg/mL plasma)	Razão entre as concentrações de PHT no plasma e no cérebro	Massa de CBZ x massa de tecido (mg/mg)	Concentração de CBZ no plasma (µg/mL plasma)	Razão entre as concentrações de CBZ no plasma e no cérebro
1	0,00605	6,59	1087,58	0,01754	11,22	639,59
2	0,01125	13,86	1232	0,01520	8,87	583,23
3	0,00942	20,34	2158,02	0,01436	8,74	608,30
4	0,01252	14,7	1173,62	0,01747	11,66	667,24
5	0,0152	11,16	734,21	ND	ND	ND
6	0,01555	16,6	1067,14	0,01547	9,2	594,46
7	0,02391	26,29	1099,19	ND	ND	ND
8	0,00851	9,7	1138,69	0,00912	6,64	728,04
9	0,00397	13,56	3411,87	ND	ND	ND
10	ND	20,38	ND	0,00969	5,96	614,50
11	0,00981	8,43	859,27	ND	ND	ND
12	ND	10,65	ND	0,01288	8,06	352,34

CBZ: carbamazepina; PHT: fenitoína. ND = Não disponível.

4.3 Quantificação dos fármacos no plasma

Na Tabela 7 temos um resumo dos 12 pacientes participantes do estudo com seus respectivos esquemas de dosagem e na Tabela 8 estão os resultados da quantificação plasmática dos FAEs utilizados por cada um dos pacientes.

Tabela 7: Regime medicamentoso dos pacientes do grupo de estudo.

Paciente	PB (mg/dia)	CBZ (mg/dia)	LTG (mg/dia)	PHT (mg/cirurgia)	Outros (mg/dia)
1	-	1600	-	700	IMP (25), CLB (40)
2	-	1000	-	650	CLB (15)
3	-	1200	-	600	CLB (10), TPM (200)
4	-	1000	-	700	CLB (20)
5	100	-	-	700	OXC (900), CLB (40)
6	-	1200	-	750	-
7	-	-	350	750 + 400 mg/dia	CLN (2)
8	-	NA	-	NA	CLB (NA)
9	-	-	-	700	CLB (20), DZP (10), OXC (1800)
10	-	1000	500	700	HCTZ (25), ENP (20), SNV (20)
11	100	-	400	600	OXC (1500)
12	-	600	350	700	CLN (2)

PB: fenobarbital; CBZ: carbamazepina; LTG: lamotrigina; PHT: fenitoína; IMP: imipramina; CLB: clobazam; TPM: topiramato; OXC: oxcarbazepina; CLN: clonazepam; DZP: diazepam; HCTZ: hidroclorotiazida; ENP: enalapril; SNV: sinvastatina. “-” = o paciente não utilizava esse fármaco. NA: dose não informada.

Tabela 8: Concentração plasmática dos FAEs

Paciente	PB (µg/mL plasma)	CBZ (µg/mL plasma)	LTG (µg/mL plasma)	PHT (µg/mL plasma)
1	-	11,22	-	6,59
2	-	8,87	-	13,86
3	-	8,74	-	20,34
4	-	11,66	-	14,70
5	12,66	-	-	11,16
6	-	9,20	-	16,6
7	-	-	1,26	26,29
8	-	6,64	-	9,70
9	-	-	-	13,56
10	-	5,96	2,51	20,38
11	15,65	-	10,29	8,43
12	-	8,06	-	10,65

PB: fenobarbital; CBZ: carbamazepina; LTG: lamotrigina; PHT: fenitoína.

4.4 Análise da expressão gênica

A análise da expressão do gene ABCB1, demonstrada na Figura 6, mostrou que não houve alteração na expressão do gene no grupo experimental.

A Figura 7 representa as curvas de amplificação durante RT-qPCR, utilizada para a análise da expressão gênica. É possível observar a similaridade das curvas de amplificação, evidenciada pela sobreposição das curvas das amostras do grupo controle e do grupo experimental.

Figura 6: Expressão relativa do gene ABCB1 no grupo de estudo, aqui denominado experimental, e no grupo controle. Os genes VWF e ACTB foram utilizados como genes de referência. Média $\pm$ Desvio Padrão. Não houve diferença estatística. Teste t de Student: $p > 0,05$.

Figura 7: Imagem representativa da reação de RT-qPCR com a amplificação do gene ABCB1 nos grupos controle (A, verde) e experimental (B, vermelho), demonstrando a similaridade de amplificação das amostras dos dois grupos (C).

4.5 Relação entre a razão plasma:cérebro dos fármacos e a expressão da glicoproteína-P

Com o objetivo de entender a relação entre a expressão do gene ABCB1 e a concentração plasmática dos FAEs PHT e CBZ, uma análise de correlação de Pearson foi feita entre os dois parâmetros, sendo que cada fármaco foi analisado separadamente. A Figura 8 mostra a correlação de Pearson entre a expressão do gene ABCB1 e a razão plasma:cérebro de PHT; e a Figura 9 mostra a correlação de Pearson entre a expressão do gene ABCB1 e a razão plasma:cérebro de CBZ.

Figura 8: Gráfico ilustrativo da relação entre a razão plasma:cérebro do medicamento PHT e a expressão do gene ABCB1 em relação aos genes controle. PHT: fenitoína.

Figura 9: Gráfico ilustrativo da relação entre a razão plasma:cérebro do medicamento CBZ e a expressão do gene ABCB1 em relação aos genes controle. CBZ: carbamazepina.

Confrontamos a razão plasma:cérebro dos medicamentos CBZ e PHT e a expressão da PgP no córtex temporal na tentativa de descobrir como uma medida se relaciona com a outra. A falta de correlação sugere que as diferentes quantidades de fármaco encontradas no tecido cerebral não dependem apenas da quantidade de PgP expressa no tecido e, provavelmente outros fatores também influenciam a entrada e acúmulo dos fármacos estudados no córtex temporal dos pacientes estudados. Não confrontamos o PB e a LTG com a expressão da PgP porque o número de pacientes que utilizavam esses dois fármacos à época do estudo era muito pequeno, sendo dois utilizando o PB e quatro utilizando a LTG.

Uma explicação para a falta de correlação entre a razão plasma:cérebro dos medicamentos e expressão de PgP em pacientes refratários pode estar no tecido utilizado no estudo, nesse caso o córtex cerebral. A maioria dos estudos faz suas análises no hipocampo cerebral, local de onde as crises são originárias em casos de epilepsia secundária à esclerose hipocampal, mas poucos estudos olham com mais cuidado para o córtex.

Julgamos que esse seja um dado importante pois o córtex pode ser um caminho usado pelo impulso que leva a crise para outras áreas do cérebro, e o controle do sinal da crise deve ser efetivo em todo o cérebro.

Por outro lado, um trabalho de 2013 pode nos ajudar na discussão desse resultado, pois seu alvo foi estudar se os FAEs são de fato substratos da PgP. Dickens e seus colaboradores descobriram que a PHT foi fracamente transportada em dois modelos de transporte por PgP e não foi transportada em outros cinco modelos; enquanto a CBZ e a LTG não foram transportada em nenhum dos sete modelos testados pelo grupo (DICKENS et al., 2013.) Nosso trabalho está de acordo e se esse resultado for confirmado e consolidado em pesquisas futuras, a teoria de que o

transporte do fármaco é o problema central da fármaco-resistência ficará enfraquecida e outras hipóteses deverão ser formuladas na tentativa de elucidar a real causa da fármaco-resistência na epilepsia.

Apesar de entendermos como tratar alguns tipos de epilepsia de maneira eficaz, alguns autores reconhecem que ainda não conhecemos todos os eventos regulatórios que determinam a resistência aos FAEs (HITIRIS et al., 2007).

Outro resultado encontrado foi a similaridade na expressão da PgP nos dois grupos estudados. O grupo controle composto por indivíduos que evoluíram para óbito por causas naturais evidenciou uma expressão de PgP muito parecida com a encontrada no grupo de estudo. Esse resultado também pode abalar a hipótese da fármaco-resistência induzida por superexpressão de Pgp pois a base dos primeiros trabalhos que correlacionam a fármaco-resistência com a PgP é a superexpressão desta glicoproteína no grupo de pacientes resistentes em relação à pacientes não-epilépticos, e esse não foi o resultado encontrado em nosso estudo. Novamente, podemos aventar a possibilidade de haver pouco envolvimento do córtex temporal na geração e manutenção das crises epilépticas secundárias à esclerose hipocampal, e nesse caso a similaridade entre a expressão da PgP nos dois grupos não teria significado negativo na teoria que relaciona a PgP e a epilepsia refratária.

Em um artigo de 2013 Weaver e 00 relatam que durante a *2nd Halifax International Epilepsy Conference & Retreat* foram levantados dez pontos considerados importantes para melhorar a qualidade de vida dos pacientes vivendo com epilepsia refratária e entre esses pontos estão: a necessidade de uma definição de epilepsia fármaco-resistente dinâmica e baseada em evidências; entendimento bioquímico e biomolecular da etiopatogênese da epilepsia fármaco-resistente; e modelos animais de representativos para a condição de refratariedade (WEAVER e

POHLMANN-EDEN, 2013). Esse estudo reflete muito bem as dificuldades encontradas atualmente nesse campo de pesquisa e enfrentados por nosso grupo. O cérebro é um órgão nobre e qualquer intervenção neste deve ser cuidadosa. Essas características dificultam experimentos mais elaborados, como inibição de enzimas, receptores e transportadores *in vivo*.

Para que alcancemos o entendimento definitivo sobre a fármaco-resistência é necessário compreender, em nível molecular, a cascata de eventos que ocorrem durante a crise epilética. Weaver e Pohlmann-Eden apontam que para chegarmos à tal nível de entendimento será necessário repensar nossos conhecimentos, estendê-los além o que se sabe atualmente sobre neurotransmissores, canais iônicos proteicos e sobre vários genes. Uma alteração que envolve mudança na maneira como um gene se expressa e trabalha sem alterar sua sequência genética é a epigenética. Devemos percorrer todos os caminhos possíveis para estudar uma condição tão complexa como a epilepsia, e explorar a epigenética é um desses caminhos. Seria a resistência aos fármacos definida pela epigenética ou até mesmo por um mecanismo autoimune? Este tipo de epilepsia tem sido discutido e sua hipótese levantada após a detecção de anticorpos antineurais e assim, ganhamos mais um caminho a seguir, seguindo os autores citados.

Rogawski em 2008 e Li em 2011, juntamente com seus colaboradores, defendem que uma nova visão sobre a fármaco-resistência será alcançada quando novas abordagens dos métodos biomoleculares e bioquímicos forem colocadas em prática; e com isso haverá avanços no diagnóstico e no tratamento das epilepsias também (ROGAWSKI e JOHNSON, 2008; LI et al., 2011).

Uma das limitações enfrentadas no presente trabalho é consequência da matriz biológica eleita para o estudo, o cérebro, pois toda e qualquer intervenção nesse órgão

será extremamente delicada e é praticamente impossível fazer modificações, estruturais ou no tratamento de doenças, apenas para fins de pesquisa. Outra limitação é decorrente da própria epilepsia. O grupo controle ideal seria composto por pacientes que apresentam epilepsia decorrente de outros motivos, que não a esclerose hipocampal mesial, e que respondam ao tratamento farmacológico, porém esses pacientes não são operados com frequência equiparável aos pacientes epiléticos refratários, o que torna o grupo composto por pacientes que evoluíram para óbito muito mais acessível. Um estudo de maior duração, com um número amostral maior e mais homogêneo pode ser mais eficaz em mostrar a real correlação entre a expressão da PgP com as concentrações de fármacos epiléticos.

5. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, sugere-se que não existe correlação entre a quantidade de fármaco transportado a partir do plasma para o córtex temporal e a expressão da glicoproteína-P na amostra utilizada sob as condições do presente estudo. Também não foi encontrada diferença estatística entre a expressão de PgP no córtex temporal de indivíduos epiléticos e no córtex de indivíduos não-epiléticos na amostra estudada.

6. REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos. ANVISA, Brasília, Resolução N.27, 17 de maio de 2012.

Basic, S.; Hajnsek, S.; Bozina, N.; Filipcic, I.; Sporis, D.; Mislov, D.; Posavec A. The influence of C3435T polymorphism of ABCB1 gene on penetration of phenobarbital across the blood—brain barrier in patients with generalized epilepsy. *Seizure*, v. 17, p. 524-530, 2008.

Betting, L.E.; Kobayashi, E.; Montenegro, M.A.; Min, L.L.; Cendes, F.; Guerreiro, M.M.; Guerreiro, C.A.M. Tratamento de epilepsia: consenso dos especialistas brasileiros. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 61, n. 4, p. 1045-1070, 2003.

Beyenburg, S.; Bauer, J.; Reuber, M. New drugs for the treatment of epilepsy: a practical approach. *Postgraduate Medical Journal*, v. 80, p. 581-587, 2004.

Berg, A.T.; Berkovic, S.F.; Brodie, M.J.; Buchhalter, J.; Cross, J.H.; Van Emde Boas, W.; Engel, J.; French, J.; Glauser, T.A.; Mathern, G.W.; Moshé, S.L.; Nordli, D.; Plouin, P.; Scheffer, I.E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*, v. 51, n. 4, p. 676-685, 2010.

Blume-Chair, W.T.; Lüders, H.O.; Tassinari, C.; van Emde Boas, W.; Engel, J. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia*, v. 42, n. 9, p. 1212-1218, 2001.

Borges, M.A.; Min, L.L.; Guerreiro, C.A.; Yacubian, E.M.; Cordeiro, J.A.; Tognola, W.A.; Borges, A.P.; Zanetta, D.M. Urban prevalence of epilepsy: Populational study in São José do Rio Preto, A medium-sized city in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 62, p. 199-204, 2004.

Brodie, M.J. Building new understandings in epilepsy: maximizing patient outcomes without sacrificing seizure control. *Epilepsia*, v. 44, n. 4, p. 1-2, 2003.

Brooks, B.S.; King, D.W.; El Gammal, T.; Meador, K.; Yaghmai, F.; Gay, J.N.; Smith, J.R.; Flanigin, H.F. MR imaging in patients with intractable complex partial epileptic seizures. *AJR Am J Roentgenol*, v. 154, n. 3, p. 577-583, 1990.

Chemicalize.org [Base de dados]. ChemAxon. [Acessado em 31 de julho de 2012] [3 telas]. Disponível em: www.chemicalize.org

Chung-Chin, K.; Ren-Shiang, C.; Lu, L.; Rong-Chi, C. Carbamazepine inhibition of neuronal Na^+ currents: quantitative distinction from phenytoin and possible therapeutic implications. *Molecular pharmacology*, v. 51, p. 1077–1083, 1997.

Cordon-Cardo, C.; O'Brien, J.P.; Casals, D.; Rittman-Grauer, L.; Biedler, J.L.; Melamed, M.R.; Bertino, J.R. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 86, n. 2, p. 695-698, 1989.

Dickens, D.; Yusof, S.R.; Abbott, N.J.; Weksler, B.; Romero, I.A.; Couraud, P.O.; Alfirevic, A.; Pirmohamed, M.; Owen, A. A Multi-System Approach Assessing the Interaction of Anticonvulsants with P-gp. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, p. e64854, 2013.

Dong, L.; Luo, R.; Tong, Y.; Cai, X.; Mao, M.; Yu, D. Lack of association between ABCB1 gene polymorphisms and pharmaco-resistant epilepsy: An analysis in a western Chinese pediatric population. *Brain Res*, v. 1391, p. 114-124, 2011.

Engel Jr, J. Surgery for seizures. *N Engl J Med*, v. 334, P. 647-653, 1996.

Fisher, R.S.; van Emde Boas, W.; Blume, W.; Elger, C.; Genton, P.; Lee, P.; Gause, W.C.; Adamovicz, J. The use of the PCR to quantitate gene expression. *Genome Res*, v. 3, p. S123-S135, 1994.

French, J.A. Refractory Epilepsy: clinical overview. *Epilepsia*, v. 48, n. 1, p. 3-7, 2007.

Fromm, M.F. P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther*, v. 38, n. 2, p. 69-74, 2000.

Guerrini, R.; Dravet, C.; Genton, P.; Belmonte, A.; Kaminska, A.; Dulac, O. Lamotrigine and seizure aggravation in severe myoclonic epilepsy. *Epilepsia*, v. 39, p. 508–12, 1998.

Glauser, T.; Ben-Menachem, E.; Bourgeois, B.; Cnaan, A.; Hadwick, D.; Guerreiro, C.; Kalviainen, R.; Mattson, R.; Perucca, E.; Tomson, T. ILAE treatment guidelines: Evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia*, v. 47, n. 7, p. 1094–1120, 2006.

Hauser, W.A.; Annegers, J.F.; Rocca, W.A. Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from rochester, minnesota. *Mayo Clin Proc*, v. 71, p. 576-586, 1996.

Hauser, W.A.; Beghi, E. First seizure definitions and worldwide incidence and mortality. *Epilepsia*, v. 49, n. 1, p. 8-12, 2008.

Hitiris, N.; Mohanraj, R.; Norrie, J.; Sills, G.J.; Brodie, M.J. Predictors of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsy Res*, v. 75, p. 192–196, 2007.

Horio, M.; Gottesman, M.M.; Pastan, I. Atp-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 85, p. 3580-3584, 1988.

ILAE. Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. Commission on epidemiology and prognosis, international league against epilepsy. *Epilepsia*, v. 34, p. 592-596, 1993.

ILAE. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the commission on classification and terminology of the international league against epilepsy. *Epilepsia*, v. 22, p. 489-501, 1981.

ILAE. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on classification and terminology of the international league against epilepsy. *Epilepsia*, v. 30, p. 389-399, 1989.

Jetté, L.; Murphy, G.F.; Leclerc, J.M.; Beliveau, R. Interaction of drugs with P-glycoprotein in brain capillaries. *Biochem Pharmacol*, v. 50, n. 10, p. 1701-1709, 1995.

Kwan, P.; Brodie, M.J. Potential Role of Drug Transporters in the Pathogenesis of Medically Intractable Epilepsy. *Epilepsia*, v. 46, n. 2, p. 224–235, 2005.

Kwan, P.; Arzimanoglou, A.; Berg, A.T.; Brodie, M.J.; Allen Hauser, W.; Mathern, G.; Moshé, S.L.; Perucca, E.; Wiebe, S.; French, J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, v. 51, n. 6, p. 1069-77, 2010.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

Leveille-Webster, C.R.; Arias, I.M. The biology of the P-glycoproteins. *J Membr Biol*, v. 143, n. 2, p.:89-102, 1995.

Li, H.; McDonald, W.; Parada, I.; Faria, L.; Graber, K.; Takahashi, D.K.; Ma, Y.; Prince, D. Targets for preventing epilepsy following cortical injury. *Neurosci Lett*, v. 497, p. 172–176, 2011.

Löscher, W.; Delanty, N. MDR1/ABCB1 polymorphisms and multidrug resistance in epilepsy: in and out of fashion. *Pharmacogenomics*, v. 10, n. 5, p. 711-713, 2009.

Löscher, W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Pharmacological Sciences*, v. 23, n. 3, p. 113-118, 2002.

Löscher, W.; Schmidt, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. *Epilepsy Research*, v. 50, p. 3-16, 2002.

Mackay, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*, v. 10, p. 190–212, 2004.

Masia, S.L.; Devinsky, O. Epilepsy and Behavior: A Brief History. *Epilepsy & Behavior*, v. 1, p. 27–36, 2000.

Matsumoto, T.; Tani, E.; Kaba, K.; Shindo, H.; Miyaji, K. Expression of P-glycoprotein in human glioma cell lines and surgical glioma specimens. *J Neurosurg*, v. 74, n. 3, p. 460-466, 1991.

Meldrum, B.S. Update on the mechanism of action of antiepileptic drugs. *Epilepsia*, v. 37, n. 6, p. S4–11, 1996.

Morrow, C.S.; Cowan, K.H. Mechanisms and clinical significance of multidrug resistance. *Oncology*, v. 2, p. 55-63, 1988.

Moshe, S.L.; Sperber, E.F.; Velisek, L. Critical issues of developmental seizure disorders. *Physiol Res*, v. 42, p. 145-154, 1993.

Nolan, T.; Hands, R.E.; Bustin, S;A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, v. 1, n. 3, p. 1559-1582, 2006.

Oguni, H. Diagnosis and treatment of epilepsy. *Epilepsia*, v. 45, n.8, p. 13-16, 2004.

Oliveira, J.; Gouveia, O. Transtornos psiquiátricos associados à epilepsia. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 33, n. 5, p. 160-164, 2003.

Parra, J.; Augustijn, P.B.; Geerts, Y.; van Emde Boas W. Classification of epileptic seizures: A comparison of two systems. *Epilepsia*, v. 41, n. 4, p. 476-482, 2001.

Pellock, J.M. Standard approach to antiepileptic drug treatment in the United States. *Epilepsia*, v. 35, n. 4, p. S11-S18, 1994.

Perucca, E. Pharmacoresistance in epilepsy: how should it be defined? *Cns Drugs*, v. 10, p. 171-179, 1998.

Perucca, E, Gram L, Avanzini G, Dulac O. Antiepileptic drugs as a cause of worsening seizures. *Epilepsia*, v. 39, p. 5–17, 1998.

Perucca, E. The clinical pharmacology and therapeutic use of the new antiepileptic drugs. *Fund Clin Pharmacol*, v. 15, p. 405–7, 2001.

Perucca, E. An Introduction to Antiepileptic Drugs. *Epilepsia*, v. 46, n. 4, p. 31-37, 2005.

Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, v. 29, n.9, p. e45, 2001.

Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W.; Dempfle, L. Relative expression software tool (REST_) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. *Nucleic Acids Res*, v. 30, p. e36, 2002.

Regesta, G.; Tanganelli, P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy res*, v.34, p. 109-122, 1999.

Renart, J.; Reiser, J.; Stark, G.R. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *PNAS*, v. 76, n. 7, p. 3116-3120, 1979.

Riordan, J.R.; Ling, V. Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. *Pharmacol Ther*, v. 28, p. 51-75, 1985.

Rogawski, M.A.; Johnson, M.R. Intrinsic severity as a determinant of antiepileptic drug refractoriness. *Epilepsy Curr*, v. 8, n. 5, p. 127-130, 2008.

Rowland, M.; Lewis, P.; *Merrit Tratado de Neurologia*, 9º edição. Rio de Janeiro, Ed Guanabara Koogan, 1997.

Sander, J.W. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia*, v. 34, n. 6, p. 1007-16, 1993.

Sander, J.W. The natural history of epilepsy in the era of new antiepileptic drugs and surgical treatment. *Epilepsia*, v. 44, n. 2, p. 17-20, 2003.

Santos, A.A.; Malaguti, C.; Dal Corso, S.; Silva, C.A. Expressão das metaloproteinases da matriz 2 e 9 na saliva de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. *Fisioterapia e Pesquisa*, v. 16, n. 4, p. 299-305, 2009.

Sarkadi, B.; Müller, M.; Holló, Z. The multidrug transporters--proteins of an ancient immune system. *Immunol Lett*, v. 54, n.2-3, p. 215-219, 1996.

Sarmiento, M.R.S.; Minayo-Gomez, C. A epilepsia, o epilético e o trabalho: relações conflitantes. *Caderno de Saúde Pública*, v. 16, n. 1, p. 183-193, 2000.

Schmidt, B. Clinical development of antiepileptic drugs in adults, *Neurotherapeutics*, v. 4, p. 62–69, 2007.

Schmidt, D.; Löscher, W. Drug Resistance in Epilepsy: Putative Neurobiologic and Clinical Mechanisms. *Epilepsia*, v. 46, n. 6, p. 858–877, 2005.

Seino, M. Classification criteria of epileptic seizures and syndromes. *Epilepsy Res*, v. 70, n. 1, p. S27-S33, 2006.

Siddiqui, A.; Kerb, R.; Weale, M.E.; Brinkmann, U.; Smith, A.; Goldstein, D.B.; Wood, N.W.; Sisodiya, S.M. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med*, v. 348, p. 1442-1448, 2003.

Silva, A.N.S.; Andrade, V.M.; Oliveira, H.L. Avaliação neuropsicológica em portadores de epilepsia do lobo temporal. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 65, n. 2b, p. 492-497, 2007.

Sisodiya, S.M.; Lin, W.R.; Harding, B.N.; Squier, M.V.; Thom, M. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain*, v. 125, p. 22-31, 2002.

Syvänen, S.; Luurtsema, G.; Molthoff, C.F.M.; Windhorst, A.D.; Huisman, M.C.; Lammertsma, A.A.; Voskuy, R.A.; de Lange, E.C. (R)-[¹¹C]Verapamil PET studies to assess changes in P-glycoprotein expression and functionality in rat blood-brain barrier after exposure to kainate-induced status epilepticus. *BMC Medical Imaging*, v. 11, p. 1-16, 2011.

Theodore, W.H.; Porte, R.J.; Albert, P.; Kelley, K.; Bromfield, E.; Devinsky, O.; Sato, S. The secondarily generalized tonic-clonic seizure: a videotape analysis. *Neurology*, v. 44, p. 1403-7, 1994.

Tishler, D.M.; Weinberg, K.T.; Hinton, D.R.; Barbaro, N.; Annett, G.M.; Raffel, C. *MDRI* Gene Expression in Brain of Patients with Medically Intractable Epilepsy. *Epilepsia*, v. 36, p. 1-6, 1995.

Tomson, T. Drug selection for the newly diagnosed patient: When is a new generation antiepileptic drug indicated? *Journal of Neurology*, v. 251, p. 1043-1049, 2004.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

Ueda, K.; Cornwell, M.M.; Gottesman, M.M.; Pastan, I.; Roninson, I.B.; Ling, V.; Riordan, J.R. The *mdrl* gene, responsible for multidrug resistance, codes for p-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 141, P. 956-62, 1986.

Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002.

Weaver, D.F.; Pohlmann-Eden, B. Pharmacoresistant epilepsy: Unmet needs in solving the puzzle(s). *Epilepsia*, v. 54, Suppl. S2, p. 80–85, 2013.

7. APÊNDICES

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o grupo de pacientes epiléticos

O estudo do qual o(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, **“Expressão da glicoproteína-p e sua influência na concentração de fármacos antiepiléticos em tecido cerebral de pacientes com epilepsia”**, desenvolvido pela farmacêutica Flavia Isaura de Santi Ferreira, sob orientação da Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz, tem por objetivo avaliar a expressão do gene ABCB1 em pacientes com epilepsia fármaco-resistente e seu efeito sobre o medicamento utilizado para o controle das crises. Essa pesquisa é importante porque vai nos ajudar a entender um pouco mais sobre a Glicoproteína-P na epilepsia que não responde aos medicamentos, como é o seu caso. Estamos investigando se essa Glicoproteína é responsável por impedir que o medicamento entre no seu cérebro e ajude a controlar suas crises.

Caso o(a) senhor(a) aceite participar, vou retirar uma amostra do tecido cerebral removido durante a cirurgia e ela será devidamente separada e guardada para dosagem do(s) medicamento(s) que o(a) senhor(a) utiliza para tratar a epilepsia e para dosagem da Glicoproteína-P por meio de técnicas de biologia molecular. Também serão colhidos 3 (dois) tubos de sangue para dosagem do(s) medicamento(s).

O estudo não lhe trará nenhum tipo de constrangimento moral ou ético. Não haverá nenhum desconforto físico causado apenas para os fins da pesquisa, já que o material necessário será colhido durante procedimento cirúrgico indicado pelo seu médico. Nenhum tipo de gasto está envolvido com sua participação, assim como o estudo não interfere de maneira alguma em seus atendimentos pelo Hospital das Clínicas. Será mantido sigilo total de todas as informações fornecidas em qualquer uma das etapas. A publicação anônima dos resultados se destina exclusivamente a divulgação destes em meios científicos.

O(a) senhor(a) possui a garantia do completo esclarecimento de todas as suas dúvidas durante o desenvolvimento do trabalho e está livre para desistir de sua participação em qualquer etapa do estudo, sem que isso lhe cause nenhum tipo de constrangimento ou prejuízo sobre seu tratamento e cuidados médico/farmacêutico, tanto pela pesquisa quanto pelos serviços oferecidos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Flavia Isaura de Santi Ferreira

Farmacêutica - CRF-SP 53363

Doutoranda do Programa de Toxicologia

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Endereço e para contato: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Campus da USP

Sala 69 A-A, Bloco A

Avenida do Café, s/n – Ribeirão Preto – SP

Telefones: (16) 3602-4259 / (16) 8803-7046

Certificado de Consentimento

Eu, _____, portador do RG nº _____, declaro que, após convenientemente esclarecido(a) pela pesquisadora e ter compreendido o que me foi explicado, concordo em participar da pesquisa, por livre e espontânea vontade.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 201__

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador responsável

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o grupo controle

Coleta de material para pesquisa durante necropsia

Por meio deste documento, pedimos autorização para a coleta de 1 (um) fragmento cerebral pequeno (aproximadamente 1 centímetro) e 10 mL (1 colher de sopa, aproximadamente) de sangue durante a necropsia realizada no Serviço de Verificação de Óbito (SVOi) do paciente:

(Nome do paciente)

Essas amostras serão utilizadas em uma pesquisa que se chama **“Expressão da glicoproteína-p e sua influência na concentração de fármacos antiepilépticos em tecido cerebral de pacientes com epilepsia”** que está sendo desenvolvido pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas em conjunto com a Faculdade de Medicina, na USP de Ribeirão Preto.

Essa pesquisa é importante porque ela nos ajudará a entender um pouco mais sobre o tratamento de epilepsia. Alguns pacientes que tem essa doença tomam o remédio todos os dias e mesmo assim não melhoram das crises, então estamos tentando entender porque isso acontece. Para isso, fazemos comparações do cérebro dos pacientes doentes com o cérebro de pacientes que não tem epilepsia.

Caso o(a) senhor(a) permita que a coleta de cérebro e sangue seja feita, vou retirar uma amostra do cérebro e 2 (dois) tubos de sangue da veia da perna de seu familiar durante a necropsia.

Muito importante:

- Ninguém é obrigado a autorizar a coleta de amostras, então não tenha vergonha de recusar meu pedido;
- Caso o(a) sr(a) autorize as coletas, estas serão realizadas apenas no caso do cérebro do(a) paciente ser examinado, o que significa que o médico legista não examinará o cérebro apenas para nossa pesquisa;
- O presente estudo não trará nenhum tipo de constrangimento moral ou ético ao responsável pela autorização da coleta ou ao doador das amostras;
- Não haverá nenhum tipo de cobrança por qualquer procedimento;
- Este estudo não interfere de maneira alguma com os procedimentos da necropsia, portanto caso a coleta não seja autorizada, a necropsia e a liberação do corpo serão realizadas normalmente.

- Será mantido sigilo total de todas as informações fornecidas em qualquer uma das etapas e a publicação anônima dos resultados se destina exclusivamente a divulgação destes em meios científicos.

- O(a) senhor(a) pode me perguntar o que quiser e todas as suas dúvidas serão respondidas agora ou durante o desenvolvimento do trabalho e o(a) senhor(a) está livre para retirar sua autorização em qualquer etapa do estudo, sem que isso lhe cause nenhum tipo de constrangimento ou prejuízo sobre os serviços prestados pelo SVOi ou por qualquer outra instituição ligada à USP.

- Todo o material coletado e não utilizado para a pesquisa será descartado, então nenhum material será utilizado em outra pesquisa.

Flavia Isaura de Santi Ferreira

Farmacêutica - CRF-SP 53363 / Aluna de Doutorado do Programa de Toxicologia

da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Avenida do Café, s/n, CEP 14040-903 Sala 69 A-A

Telefone para contato: (16) 3602-4259 / 98803-7046

Certificado de Consentimento

Por meio deste documento, autorizo a retirada de fragmento cerebral e sangue do paciente_____. Declaro também ter sido convenientemente esclarecido(a) pela pesquisadora e ter compreendido o que me foi explicado, concordando assim por livre e espontânea vontade.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 201__

Assinatura e RG do familiar e/ou responsável

8. ANEXOS

8.1 Anexo I

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 27 de outubro de 2011

Projeto de pesquisa: “Expressão de glicoproteína-p e sua influência na concentração de fármacos antiepiléticos em tecido cerebral de pacientes com epilepsia”.

Pesquisadores responsáveis: Prof^a Dr^a Regina Helena Costa Queiroz (Orientadora) / Flávia Isaura De Santi Ferreira (Doutoranda).

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

“O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar”.

Ciente e de acordo:

Dr^a Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - HCFMRP-USP

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho
Coordenador da Unidade de Pesquisa
Clínica – UPC - HCFMRP-USP

1/1

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA do HCFMRP-USP
(16) 3602-2228
cep@hcrp.fmrp.usp.br

8.2 Anexo II

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 91/2011
kms

Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2011.

À
PÓS-GRADUANDA FLÁVIA ISAURA DE SANTI FERREIRA
Orientadora: Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz
DACTB / FCFRP / USP

Prezada Pós-graduanda,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "EXPRESSÃO DE GLICOPROTEÍNA-P E SUA INFLUÊNCIA NA CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS EM TECIDO CEREBRAL DE PACIENTES COM EPILEPSIA", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 225**, foi aprovado *ad referendum* do Comitê em 26.09.2011.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "*o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador*".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Atenciosamente,

PROF.ª. DR.ª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

8.3 Anexo III

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 014/2014
kms

Ribeirão Preto, 15 de abril de 2014.

À Pós-graduanda
Flávia Isaura de Santi Ferreira
Orientadora: Profª. Drª. Regina Helena Costa Queiroz
Depto. de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP/USP

Prezadas Pesquisadoras,

Informamos que a emenda do projeto de pesquisa intitulado "EXPRESSÃO DE GLICOPROTEÍNA-P E SUA INFLUÊNCIA NA CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS EM TECIDO CEREBRAL DE PACIENTES COM EPILEPSIA", apresentado por Vossas Senhorias a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 225** foi analisada e aprovada pelo CEP em sua 128ª reunião ordinária, realizada em 14.04.2014.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de **emenda** na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

8.4 Anexo IV

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.1052.53.9), intitulado "Influência da Iontoforese na Imunização Transcutânea Utilizando Lipossomas e Nanopartículas Metálicas", de autoria de **Daniela Spuri Bernardi** e de **Renata Fonseca Vianna Lopez**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 10.12.2012.

Colaboradora: Lúcia Helena Faccioli

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.1052.53.9), entitled: "Influência da Iontoforese na Imunização Transcutânea Utilizando Lipossomas e Nanopartículas Metálicas", by **Daniela Spuri Bernardi** and **Renata Fonseca Vianna Lopez**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, December, 10 2012.

Ribeirão Preto, 14 de dezembro de 2012.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro